

Intraperitoneaalinen Wnt inhibitiohoito neonataalihiirillä

Jasser Anoschkin

Lääketieteen kandidaatti

Medicum, Farmakologia

Helsinki 20.9.2019

Tutkielma

jasser.anoschkin@helsinki.fi

Ohjaajat: Eero Mervaala, Esko Kankuri

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Medicum	
Tekijä – Författare – Author Jasser Anoschkin			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Intraperitoneaalinen Wnt inhibitihoito neonataalihiirillä			
Oppiaine – Läroämne – Subject Lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma		Aika – Datum – Month and year 9/2019	Sivumäärä -Sidoantal - Number of pages 34

Tiivistelmä – Referat – Abstract

Tutkimuksen tavoitteena oli edistää hallitun sydänregeneraatiohoidon löytymistä. Sydäninfarktista paraneminen ilman arpea, vähentäisi infarktien aiheuttamaa tautitaakkaa, pidentäisi infarktipotilaiden elinikää ja parantaisi elämänlaatua. Konkreettisenä tavoitteena oli selvittää miten neonataalihiiret, joita käytetään infarktitutkimuksissa, sietävät vatsakalvon sisään annettua injektioina toteutettua Wnt-inhibiittorihoitoa. Wnt inhibiittorina käytettiin XAV-939 yhdistettä. Lisäksi tutkittiin aiheuttaako yhdiste muutoksia neonataalihiirien sydämien histologiaan tai hapenkulutukseen. Pienimolekyylisellä Wnt-inhibiittori XAV-939:llä on arveltu olevan myönteisiä arpikudosta vähentäviä vaikutuksia, mahdollisesti myös sydämen infarktin jälkeisissä sydänvaurioissa.

Tutkimuksen aikana annettiin neonataalihiirille (N=104) pistoshoitona kuljetinainetta joko XAV-939 -yhdisteen kanssa tai ilman. Pistoshoito annettiin vatsakalvon sisälle seitsemän päivän ajan, jonka jälkeen hiiret lopetettiin. Lääkkeen kuljettimena toimi joko fysiologinen suolaliuos tai maapähkinäöljy. Hoidon vaikutuksia arvioitiin hiirten kuolleisuuden, kokonaispainon kehityksen, sydämen painon, sydänsolujen mitokondrioiden hapenkulutuksen ja histologian avulla.

Hiiret sietivät hoitoa hyvin, yksi hiiri kuoli hoidon aikana. Hiirten painon kehityksessä tai sydämien painoissa lopetushetkellä ei havaittu eroa ryhmien välillä. Lääkemolekyyliryhmissä ja kontrolliryhmissä sydämen histologia oli HE-värjättynä normaali. Sydämien mitokondrioiden hapenkulutustasossa havaittiin laskua verrattuna kontrolliryhmään, kun lääke annettiin sekoitettuna fysiologiseen suolaliuokseen. XAV-939:n liukoisuus tähän vehikkeliin todettiin huonoksi, eikä löydöksestä voi vetää vahvoja johtopäätöksiä ilman lisäselvityksiä.

Tuloksia ja kokemuksia voidaan käyttää pohjana pohdittaessa, millä asetelmalla edetään tutkimaan hoidon vaikutuksia hiirillä, joille aiheutetaan myös infarkti. Tutkielman yhteydessä kertyi myös aineistoa hiirten pakastettuina sydäminä ja sydänleikkeinä. Näistä on mahdollisuus teettää myöhemmissä tutkimuksissa esimerkiksi PCR määrittäyksiä ja erilaisia histologisia värjäyksiä. (213 sanaa)

Avainsanat – Nyckelord – Keywords

wnt inhibitor, mitochondria, XAV939, neonatal heart

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited

Terveystieteiden keskuskirjasto ja Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto Helda

Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

1 Johdanto.....	1
1.1 Sydäninfarkti	2
2 Kirjallisuuskatsaus.....	4
2.1 Neonataalihiirten kokeellinen infarktimalli.....	4
2.2 Wnt signalointi ja XAV-939.....	6
2.3 Sydänlihaksen aineenvaihdunta.....	9
2.4 XAV-939:n vaikutus mitokondrioihin.....	11
3 Tutkimuksen tavoitteet	12
4 Tutkimusaineisto ja menetelmät.....	14
4.1 Hoidon valmistelut	14
4.2 Hiirten hoito ja lopetus	15
4.3 Mitokondrioiden hapenkulutuksen määrittäminen oxygraph k2- laitteella.....	17
4.4 Histologisten näytteiden käsittely ja analysointi	19
4.5 Statistiikka	19
5 Tulokset	20
5.1 Hoidon sieto ja vaikutus hiirten kasvuun	20
5.2 Hoidon vaikutukset mitokondrioiden toimintaan.....	22
5.3 Sydänhistologia	26
6 Pohdinta	30
6.1 johtopäätökset.....	32
Lähdeluettelo	33

1 Johdanto

Tällä tutkielmalla pyritään edistämään sellaisen lääkehoidon löytymistä, jonka avulla sydäninfarktista voisi parantua arvottomasti tai ainakin pienemmin pysyvin haitoin. Lähestymiskulmana on selvittää kokeellisen sydäninfarktimalin neonataalihiirille vatsakalvonsisäisinä injektioina annetun Wnt inhibiittorihoidon sietoa ja vaikutuksia. Kyseinen hiirimalli on aktiivisessa käytössä infarktitutkimuksessa. Käytännön kokeissa lääkkeen kuljetinaaineena toimivat fysiologinen suolaliuos ja maapähkinäöljy. Wnt inhibiittorina toimi pienimolekyylinen tankyraasin toimintaa estävä XAV-939 yhdiste. Lääkitsemisen ja em. aihiolääkkeen vaikutuksia tutkittiin hiirillä ilman, että niille aiheutettiin infarktia. Tutkimuskysymyksiä tarkastellaan tarkemmin omassa kappaleessaan.

Kirjallisuuskatsauksessa esitellään neonataalihiirien käyttöä infarktitutkimuksessa ja Wnt-signaloitiin sekä XAV-939:iin liittyvää tutkimustietoa. Lisäksi käydään läpi sydänlihassolun energia-aineenvaihduntaa ja XAV-939:n vaikutusta siihen niiltä osin, kun tulosten tarkastelussa on aiheesta oleellista tietää.

Tutkimusaineisto ja menetelmät osiossa kuvataan, miten tässä tutkimuksessa kahdeksan eri hiiripoikueen 104:lle neonataalihiirelle annettiin päivittäin hoitoa, miten niistä kerättiin tutkimusaineisto ja miten sitä analysoitiin. Hiiret lopetettiin seitsemän päivän ikäisinä. Tässä yhteydessä niiden sydämet irrotettiin. Hoidon vaikutuksia arvoitiin sydämien mitokondrioiden hapenkulutuksesta tai histologiasta. Ylimääräiset sydämet jäädytettiin ja varastoitiin mahdollisia myöhempiä PCR-määrittelyksiä ja muita tutkimuksia varten.

Viidennessä luvussa esitellään tutkimuksen aineistosta löydettäviä tuloksia. Hoidon sietoa arvioitiin kuolleisuudesta. Lisäksi arvioitiin sekä kokonaispainon että sydämen painon kehittymistä. Mitokondrioiden toimintafunktioista etsittiin eroja eri hoitoa saaneiden ryhmien välillä. HE- värjätyistä histologisista leikkeistä etsittiin eroja

normaalihistologiaan mm. sidekudoksen laadun ja määrän eroista ryhmien välillä. Viimeisessä luvussa pohdintaan tuloksia ja niiden merkitystä.

1.1 Sydäninfarkti

Sydän saa verenkiertonsa sepelvaltimoiden kautta. Sepelvaltimoihin voi liittyä sepelvaltimotauti, tarkemmin ilmaistuna sepelvaltimoiden valtimonkovettumistauti tai sepelvaltimoiden ateroskleroosi. Sepelvaltimotauti voi edetä sepelvaltimotukokseen ja sitä kautta paikalliseen kuolioon eli sydäninfarktiin, jonka seurauksena voi pahimmillaan olla äkkikuolema. (1)

Sepelvaltimotaudissa on oleellisilta osin kyse LDL-kolesterolin kertymisestä valtimon sisäkerrokseen. Aluksi kertymä on rasvajuosteita, joita kertyy kaikille erityisesti sepelvaltimoiden haaraumakohtiin. Suurempaa kertymää kutsutaan ateroomaksi. Taudin edetessä atroomat kehittävät ympärilleen sidekudosta ja muodostuu kohoumia, joita kutsutaan fiberoateroomiksi tai ateroskleroottisiksi plakeiksi. Plakin ydin on siis rasvantäyteinen ja reunoille on muodostunut plakista riippuen erilaisia määriä sidekudosta. Plakin kohdalle voi kohoumasta johtuen muodostua virtauspyörteitä ja sen seurauksena voi olla suonen epiteelisolukerroksen vaurio eli eroosio. Paranemisprosessin seurauksena sidekudoskerros paksuuntuu. Kun tämä toistuu useasti ja sidekudos aina vaan paksuuntuu, alkaa plakki muodostaa esteen veren riittävälle virtaukselle. Potilaan oireena on rasituksessa ilmenevä sydämen hapenpuutteesta johtuva rintakipu. Paksun sidekerroksen ansiosta plakki on varsin vakaa, ja oiretta voidaan kutsua alkuun vakaaoireiseksi rintakivuksi. Jos rintakipua esiintyy myös levossa, oirekuva on edennyt epävakaaksi rintakivuksi. (1)

Kaikkiin plakkeihin ei muodostu paksua sidekudoskuorta. Tällainen ohuen kuoren, mutta suurenkin rasvaytimen yhdistelmä ahtauttaa tyypillisesti suonta vähemmän kuin paksun sidekudoskuoren omaava ja oireilee näin ollen myös vähemmän. Tällaisen plakin ohut ja sitä kautta heikko sidekudoskopio saattaa kuitenkin revetä yllättäen ja repeämän yhteyteen voi muodostua koko suonen tukkiva verihyytymä. Hyytymää muodostuu aina myös pelkän eroosion päälle, mutta alkuun suonen ollessa avoin, pieni hyytymä ei tuki suonta. Tätä eroosioireittä kehittyvän ahtauman pahentuessa, suoni lopulta tukkeutuu pienenkin

hyytymän seurauksena. Kun suoni tukkeutuu kokonaan ja sen suonitusalueen sydänsolut jäävät kokonaan vaille happea, ne kuolevat kohtalaisen nopeasti. Kyseessä on tällöin akuutti sepelvaltimotautikohtaus eli sydäninfarkti tai yleiskielessä sydänkohtaus.(1)

Sepelvaltimotautikohtauksessa siis muodostuu pitkälle edenneen ateroskleroottisen plakin yhteyteen suonen tukkiva verihyytymä. Tämä voi olla seurausta plakin pintavauriosta eli eroosiosta tai plakin repeämisestä. Kun infarktissa osa sydäimestä jää ilman happea niin sydänlihassoluja kuolee tai vaurioituu ihmisen sydämen kokoluokassa jopa miljardi kerrallaan. Jos elimistö selviää tästä, infarktin paraneminen jättää aikuisen sydämeen sidekudoksisen arven ja heikentää sydämen toimintafunktiota.(1)

Sydäninfarktin aiheuttamat vauriot korjaantuvat aikuisilla nisäkkäillä varsin huonosti itsestään. Paranemisprosessin auttaminen lääke- tai muulla hoidolla niin, että arpea ei muodostuisi, ei tällä hetkellä onnistu.(2) Vaikka kuolleisuus sydän- ja verisuoniperäisiin sairauksiin etenkin länsimaissa on laskemassa, ovat ne kuitenkin edelleen yleisin kuolinsyy maailmassa. Vuonna 2013 kaikista maailman kuolemista 31%:n syynä oli sydän- ja verisuoniperäinen sairaus. Euroopan yleisin sairaus vuonna 2013 oli sepelvaltimotauti.(3) Suomessa sairaalahoitoa sepelvaltimotautikohtauksen takia saa noin 17 000 henkilöä vuosittain. Tämän lisäksi vuosittain arviolta 6 000 ihmistä menehtyy sepelvaltimotautiin kotona tai matkalla sairaalaan. (4) Ottaen huomioon sydäninfarktien yleisyyden ja sen jälkitilan aiheuttaman tautitaakan, on mahdollisen lääkeintervention tutkiminen perusteltua.

2 Kirjallisuuskatsaus

Tässä osiossa esitellään Helsingin yliopistolla käytössä olevaa neonataalihiirten kokeellista infarktimallia ja sen käyttöä tutkimuksissa. Tarkastellaan myös lääkeaihiomolekyyli XAV-939:ää ja siihen liittyvää tuoretta tutkimustietoa. Molekyyllillä on vaikutusta Wnt signalointiin ja tätä kautta mahdollisesti käyttömahdollisuuksia sydäninfarktista toipumisen lääkkeellisessä interventiossa. Lisäksi lyhyesti kerrataan sydämen aineenvaihdunnan perusteita ja XAV-939:n vaikutusta siihen. Katsaus toimii tietolähteenä ja osaltaan perustelee kokeellisen osuuden.

2.1 Neonataalihiirten kokeellinen infarktimalli

Joillain alemmilla selkärankaisilla, kuten vesiliskoilla ja seeprakaloilla, on kyky regeneroida sydäntään erilaisista vaurioista, kuten palan leikkaamisesta sydämen kärjestä tai pistemäisestä jäätymisvauriosta, joko kokonaan tai osittain. Näillä eläimillä on tehty infarkti- ja regeneraatiotutkimusta jo 1960-luvulta asti.(2) Uutena löydöksenä vastasyntyneillä hiirillä eli neonataalihiirillä on havaittu olevan vastaava kyky parantua sydänvaurioista ilman arpea. Tämä on ensimmäinen nisäkäsmalli, jossa ilmiö havaitaan (2) (5) .

Sydäninfarktia voidaan mallintaa kirurgisella operaatiolla, jossa ompeleella tukitaan hiiren sepelvaltimo. Operaatio onnistuu jopa yhden päivän ikäiselle neonataalihiirelle. Tällaisella neonataalihiirten kokeellisella infarktimallilla voidaan tutkia infarktialueen toipumista ja toipumiseen vaikuttavia tekijöitä suoraan nisäkkäällä. Erityisen mielenkiintoisen tutkimusmenetelmän hiirimallista tekee yksipäiväisen hiiren luontainen kyky regeneroida infarktialue ilman arpikudosta ja toisaalta se, että hiiret menettävät kyvyn seitsemän päivän ikään mennessä (6). Ilmiö tarjoaa erinomaisen ikkunan tutkia sydänregeneraatiota.

Vertailemalla yhden ja seitsemän päivän ikäisten hiirten sydänten reaktiota sepelvaltimotukokseen voidaan osa sydänregeneraation salaisuuksista selvittää. Näiden kahden erilaisen paranemismekanismien molekyylitason erojen ymmärtäminen saattaa siis olla avain entistä parempaan infarktin hoitoon myös ihmisellä.(5) Parhaassa tapauksessa

ilmiön ymmärtämisellä ja hallinnalla voitaisiin tarpeen tullen turvallisesti aktivoida potilaan sydänregeneraatio. Tällaisessa aktivoinnissa olisi tietysti merkittävät syöpäriskit, jotka täytyisi saada ensin hallintaan.

Regeneraatiokyvyn menettäminen näyttäisi liittyvän happipitoisessa ympäristössä elämiseen (7)(6). Yhden ja seitsemän -vuorokauden ikäisten hiirten sydämien eroja molekyylitason mekaniikassa on valotettu Lalowski ym. 2018 julkaisemassa tutkimuksessa. Siinä osoitetaan, että yhden vuorokauden ikäinen sydänkudos nojaa energian tuotannossa pääasiassa glykolyysiin ja seitsemännen päivän kohdalla painotus on siirtynyt oksidatiiviseen fosforylaatioon. Tiedetään myös, että lasille eristetyt vastasyntyneen hiiren sydänsolut säilyttävät jakautumiskykynsä, kun niitä pidetään matalahappisessa ympäristössä. (6) Jotta kudoksessa tapahtuisi tehokasta angiogeneesiä, näyttäisi se vaativan, että kudoksesta tuottaa suuren osan energiastaan juuri glykolyysillä.(8) (9)

On siis epäily siitä, että altistuminen hapelle muuttaa aineenvaihduntaa ja että se on syynä sydämen regeneraatiokyvyn menetykselle. Infarktimallin hiirillä, joita pidetään vähähappisessa elinympäristössä, havaitaankin, että kyky regeneroida sydän säilyy jonkin verran pidempään. (7) Kuten yllä todettiin XAV-939 näyttäisi vaikuttavan myös mitokondriotoimintaan jarruttaen oksidatiivista fosforylaatiota. Tässä tutkimuksessa vertaillaan mitokondrioiden hapenkulutuskäyttäytymistä lääkettä saaneen ja lääkettä saaneen ryhmän välillä. Mitokondriot on eristetty seitsemän päivän ikäisistä sydämistä, ja poikaset ovat altistuneet huoneilmalle ilman happirajoituksia. Alenemaa oksidatiivisen fosforylaation tasossa voitaisiin pitää merkinä siitä, että lääke on saavuttanut kohdesolun riittävällä annoksella ja vaikuttanut solun toimintaan.

Kokeellisen infarktimallin hiirelle voidaan aiheuttaa sepelvaltimotukos LAD:in ympäri tehtävällä solmulla. Vaihtoehtoinen tapa on leikata pala apexia pois. Molemmat menetelmät on tarkemmin kuvattu Mahmoudin ym. (2014) protokolla julkaisussa. Helsingin yliopiston Medicum laitoksen farmakologian osastolla käytetään lähinnä LAD:in tukkimista. Tässä tutkimuksessa käytettiin neonatalihiiriä, jotka sopisivat myös infarktimalleiksi. Infarkteja ei kuitenkaan annettu, vaan tässä vaiheessa selvitettiin

vatsakalvonsisäisten injektoiden, XAV-939:n ja kuljetinaineiden vaikutuksia mallin hiirille.

2.2 Wnt signalointi ja XAV-939

Wnt signalointi on monimutkainen kokoelma eläinsolujen välisiä signaalien välitysreittejä, johon liittyy useita molekyyliä. Wnt:t itsessään ovat solun ulkopuolelle eritettäviä proteiineja ja ne toimivat ligandeina solukalvon Fizzled perheen G-proteiinikytkentäisille reseptoreille. Wnt-viestintä on pääosin parakriinistä ja autokriinistä.(10)

Wnt geenien luentaa havaitaan kaikilla monisoluisilla eläimillä kasvun ja kehityksen aikana, mutta ei ollenkaan kasveilla. Hiirellä ja ihmisellä tiedetään olevan 19 erilaista Wnt proteiineja koodaavaa geeniä. Koska nämä geenit ovat hiirten ja ihmisten välillä identtisiä eli ortologeja, on hiirimalli varsin sopiva Wnt signalointiin liittyvään lääketutkimukseen. (10) (11)

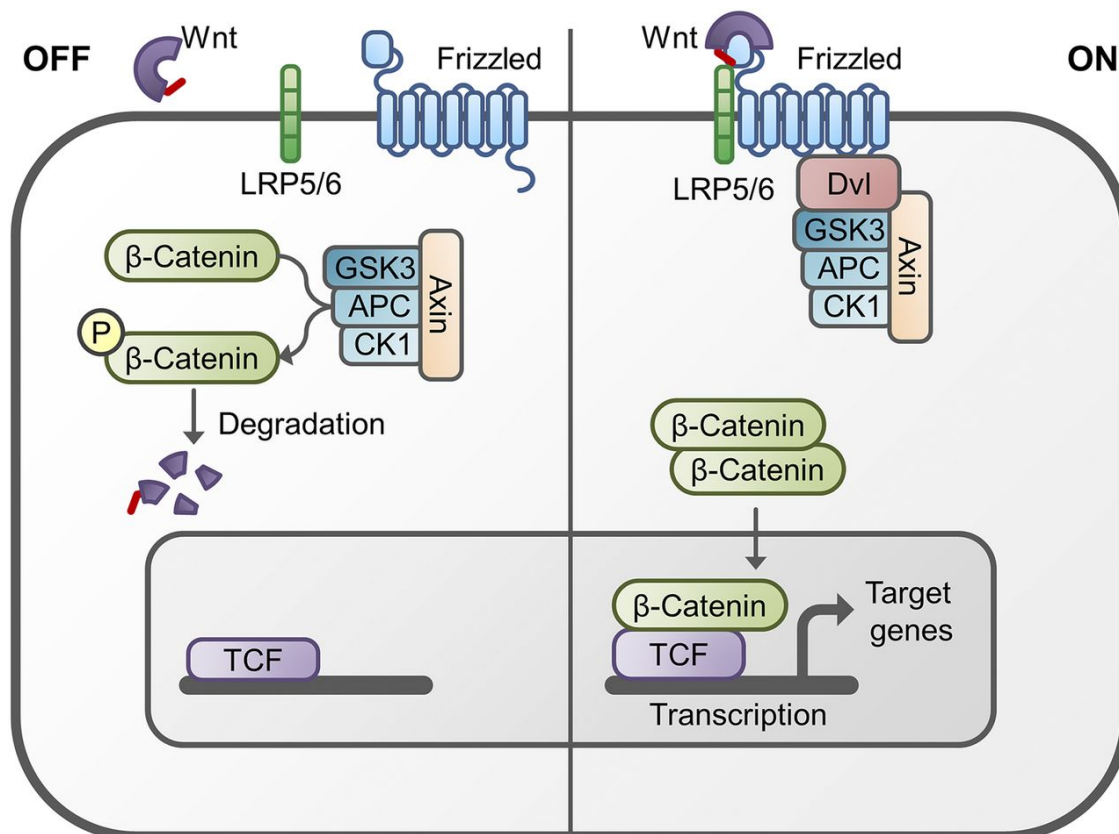
Erityisen aktiivista Wnt-signalointi on eläinten kehityksessä ja kasvussa eli silloin, kun tapahtuu solujen lisääntymistä, erikoistumista ja kudoksiksi järjestäytymistä. Wnt signalointia havaitaan hyvin pieniä määriä myös aikuisilla terveillä ihmisillä muun muassa sydämessä.(10) Tutkimusten perusteella signaloinnin uudelleen aktivoituminen havaitaan monien sairaustilojen yhteydessä. Näin käy muun muassa sydäninfartin jälkeisessä paranemisprosessissa.(10) (12)

Wnt proteiineja tiedetään siis ihmisellä ja hiirellä olevan 19 erilaista ja Fizzled reseptoreja tiedetään ihmisellä olevan kymmenen erilaista. Näiden synnyttämien erilaisten viestintämahdollisuuksien teoreettinen maksimi, jo pelkästään siinä hetkessä, kun ligandi kohtaa reseptorin, on melkoinen. Lisäksi viestin kulkiessa solun sisällä eteenpäin toimintaan osallistuu runsaasti lisää molekyyliä ja näiden tutkiminen on monimutkaista. Wnt signaalin välitykseen osallistuvien molekyylien välisen toiminnan dynamiikan hyvästä ymmärtämisestä ollaankin vielä kaukana. Kuitenkin näyttäisi siltä, että wnt-signalointiin puuttumisella on vaikutusta monen sydän- ja verisuonitaudin kulkuun ja luultavasti myös infarktista toipumiseen.(10)

Nykykäsityksen mukaan sairausprosesseissa, joissa Wnt signaaloinnilla tiedetään olevan osuutta, ajatellaan syyn olevan poikkeavassa Wnt signaaloinnin aktivaatiossa. Signaointiin liittyvien proteiineja koodaavien geenien mutaatioita ei ole osoitettu olevan syyllisiä sairausprosesseihin. Wnt-signaaloinnin re-aktivaatio eri sairastiloissa tekee siitä mahdollisen kohteen lääkkeelliselle terapialle (10).

Wnt proteiineilla tiedetään olevan kyky saada aikaan kohdesolun polarisoituminen ja erikoistumisen käynnistyminen. Näiden erityisesti alkionkehityksessä tärkeiden tapahtumien lisäksi Wnt proteiinien välityksellä tiedetään käynnistyvän ainakin kaksi muuta signaointi kanavaa: Wnt/ β -kateniini signaointi ja Wnt/ Ca^{2+} signaointi. β -kateniini välitteistä kutsutaan usein englanniksi ”canonical” ja Ca^{2+} välitteistä taas ”non-canonical”, joka olisi suomeksi ei β -kateniini välitteinen.(10)

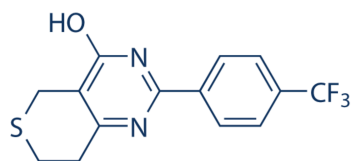
Solu tuottaa β -kateniinia jatkuvasti ja sitä tuhotaan myös jatkuvasti tuhoaja kompleksin toimesta. Tähän tuhoaja kompleksiin kuuluu seuraavat proteiinit: Aksiini, GSK3, APC ja CK1. Aksiini toimii kompleksissa ns. rakennustelineenä eli scaffold-proteiinina ja on prosessin nopeuden määräävä tekijä (rate limiting factor). Kompleksi fosforyloi β -kateniinia, mikä johtaa sen hajottamiseen. Normaalisti β -kateniinia ei siis kerry solun sisälle. Kun Wnt signaali saapuu solun Fizzled reseptoriin, sitoo syntyvä kompleksi myös tuhoajakompleksin tämän yhteyteen. Tämän vuorovaikutuksen seurauksena aksiinin stabiilius heikkenee ja sen sekä tuhoajakompleksin pitoisuudet laskevat solulimassa. β -kateniinia puolestaan pääsee kertymään solulimaan aiempaa enemmän ja sen pitoisuus nousee myös tumassa, jolla on vaikutusta geenien luentaan ja sitä kautta solun käyttäytymiseen.(10) Kaavio β -kateniini signaointiin liittyvien molekyylien toimintamekanismista on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Kaavio β -kateniini välitteisen signaloinnin toiminnasta. Kaavio on Foulquier ym. (2018) julkaisusta. Vasemmalla WNT signalointi ei vaikuta solun toimintaan, joten β -kateniiniä pilkotaan tehokkaasti. Oikealla WNT signaloinnin seurauksena β -kateniinia kertyy solulimaan ja sillä on vaikutusta geenien luentaan.

Aksiinin stabiiliuteen vaikuttaa myös solulimassa olevien tankyraasi-entsyymien pitoisuus. Tankyraasi vaikuttaa tuhoajakompleksiin, jossa aksiini on rakennustelineenä, toimintaan merkkamalla aksiineja tuhottavaksi ja ylläpitää näin tiettyä aksiini pitoisuutta.(13) Eräs mielenkiintoinen tutkimuksen kohteena tällä hetkellä olevista molekyyleistä on XAV-939. Sen molekyyli­massa on 312,31 Da, joten se luokitellaan pienimolekyyli­siin aineisiin. Kyseisen molekyylin molekyyli­rakenne on esitelty kuvassa 2. Sen inhibitorinen vaikutus kohdistuu edellä mainittuun tankyraasi-entsyymiin. Tankyraasia estämällä aksiinipitoisuudet nousevat, jonka seurauksena β -kateniinia tuhoavien kopleksien määrä nousee ja edelleen β -kateniinin fosforylointi tehostuu. β -kateniinia on solussa XAV-939:n vaikutuksesta johtuen lopulta aiempaa vähemmän. (14)(10) Tässä tutkimuksessa käytetyn XAV-939 -molekyylin vaikutus Wnt/ β -kateniini signalointiin on siis Wnt signalointia inhiboiva ja tämä mekanismi osoitettiin ensi kerran

Huang ym. (2009) julkaisussa. Varsinkin soluviljelmissä XAV-939:n aksiinin määrää lisäävä vaikutus on havaittu tämän jälkeen useaan kertaan. (15)(10)



Kuva 2. XAV-939 molekyylirakenne

Myös muita WNT inhibiittoreita on tutkittu. Xie ym. (2019) tutkimuksessa havaittiin Cardiomogeenin, vähentävän arpikudosta ja edistävän sydänregeneraatiota sydäninfarktin jälkeen seeprakalojen alkioilla. Kyseinen molekyyli on XAV-939:n tapaan pienimolekyylinen ja β -kateniiniireitin WNT inhibiittori.(16) Samaan sarjaan kuuluu myös ICG-001 ja sen on havaittu lieventävän hiirillä bleomysiinin aiheuttamaa keuhkojen arpeutumista, kun sitä on annostelu 5 mg/kg päivässä.(17)

β -kateniiniireitin WNT inhibiton on siis havaittu vaimentavan hiirillä keuhkofibroosin etenemistä lisäten hiirten elinaikaa sairauden kanssa. (17) Mekanismia selvitetessä havaittiin XAV-939-molekyylin indusoivan soluviljelmissä luuydinperäisten mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista epiteelisoluiksi. XAV-939:n ositettiin myös hillitsevän solujen lisääntymistä ja kantasolujen erilaistumista kypsiksi fibroblasteiksi. (18) On kuitenkin vielä epäselvää tulisiko β -kateniini reittiä stimuloida vai inhiboida sydäninfarktin jälkeen.(10) XAV-939:n potentiaali sydänlääkkeeksi on kuitenkin arvioitu suureksi, koska sillä on havaittu yllä mainittujen lisäksi olevan spesifisti kardiogeneesiä edistävä vaikutus ihmisalkioperäisissä kantasoluissa sekä ihmisperäisissä indusoiduissa pluripotentissa kantasoluissa (19). Tässä tutkimuksessa selvitettiin, onko lääkeainealtistuksella vaikutusta kasvavan hiiren sydänkudoksen HE-värjättyyn histologiaan, kun altistusta IP-injektioina kestää hiiren seitsemän ensimmäistä vuorokautta.

2.3 Sydänlihaksen aineenvaihdunta

Sydän on jatkuvasti työskentelevä lihas ja sen takia sillä on suuri päivittäinen energiantarve. ATP (adenosiinitrifosfaatti) on molekyyli, joka luovuttaessaan fosforihappotähteen, tai kaksi, luovuttaa samalla energiaa. ATP:n pilkkominen on kehon

ainoa reitti käyttää energiaa lihaksien supistus/rentoutus -sykliin. Aikuisen ihmisen sydänlihas tuottaa tarvitsemansa ATP:n 70-80%:sti rasvahapoista oksidatiivisella fosforylaatiolla mitokondrioissa. Loput tuotetaan glykolyysillä ja siitä syntyvän palorypälehapon/pyryvaatin hapettamisella tai proteiinien pilkkomisella. Tuotantojen suhteet muuttuvat rasituksen mukaan jonkin verran. (1)

Anarobinen ATP:n valmistus perustuu solulimassa tapahtuvaan glykolyysiin, jossa yhden glukoosimolekyylin pilkkominen kahdeksi pyryvaatiksi lataa 2 ADP (adenosiinidifosfaatti) molekyylä ATP:ksi. Solulimassa pyruvaatti etenee laktaatiksi ja tässä yhteydessä vapautuu vetyioneja, jotka laskevat kudoksen PH:ta. Tämän ja jatkuvan työskentelyn takia sydämen ATP tuotto ei voi yksistään perustua anaerobiseen menetelmään.

Happea käyttävä eli aerobinen ATP:n valmistus on sarja kemiallisia reaktioita, jotka tapahtuvat mitokondrioiden sisällä. Jos siis happea ja mitokondrioita on käytettävissä, glykolyysin tuote (pyryvaatti) hapettuu oksidatiivisessa dekarboksylaatioissa, jolloin muodostuu kaksi asetyylikoentsyymi-A:ta. Tätä molekyylä voidaan valmistaa myös rasvahapoista β -oksidaatiolla sekä joistain aminohapoista ja ketoaineista. Asetyylikoentsyymi-A:n etenee seuraavaksi sitruunahappokiertoon/Krebsin sykliin, jossa asetyyli pelkistyy hiilidioksidiksi. Samalla vapautuu elektroneja ja vetyioneja, jotka kiinnittyvät nikotiiniamidiadeniini dinukleotidiin (NADH) ja flaviinadeniinidinukleotidiin (FADH₂). Näiden kuljettamana elektronit päätyvät mitokondrion sisäkalvolle elektroninsiirtoketjuun. Elektroninsiirtoketju siirtää elektroneja neljän proteiini-kompleksin avulla kalvon yli ja edelleen hapelle, jolloin siitä ja vetyioneista muodostuu vettä. Samalla vetyjen kalvojen läpi tapahtuvan liikkeen avulla saadaan ADP-molekyyleihin kiinnitettyä lisäfosforeita eli tapahtuu oksidatiivinen fosforylaatio. Yhden glukoosin hapettamisella tällä reaktiosarjalla päästään noin 30:een ladattuun ATP:hen, kun anaerobisella glykolyysillä tuotetaan yhdestä glukoosimolekyylistä vain kaksi. On ymmärrettävää, että jatkuvasti työskentelevässä sydämessä painottuu aerobinen energiantuotto.

2.4 XAV-939:n vaikutus mitokondrioihin

Tässä tutkimuksessa käytetyn XAV-939 vaikutus solulimassa on tankyraasia estävä. Yhdisteen läsnäolon seurauksena tankyraasi ei pääse merkkamaan aksiinia niin runsaasti pilkottavaksi ja aksiinin pitoisuus pääsee nousemaan. Tällä on vaikutusta WNT-signalointiin, josta edellä tarkemmin. Aksiini pitoisuuden nousulla on sen lisäksi havaittu olevan inhiboivaa vaikutusta mitokondrioiden elektroninsiirtoketjun kompleksi IV:n toimintaan. XAV-939:lle altistettujen soluviljelmien ATP tuotannon ja hapenkulutuksen osidatiivisen fosforylaation avulla on siis havaittu laskevan. XAV-939:llä havaittu solujakautumista hidastava vaikutus selittyy osittain WNT signaloinnilla, mutta osittain myös sen vaikutuksilla mitokondriotoimintaan. (15)

3 Tutkimuksen tavoitteet

Ensisijaisena tavoitteena oli selvittää, miten neonataalihiiret sietävät vatsakalvon sisään annettua Wnt inhibiitiohoitoa. Wnt inhibiittorina toimi XAV-939 -yhdiste. Lääkkeen anto IP-hoitona on melko helppo toteuttaa neonataalihiirille verrattuna hiirten syöttämiseen tai verisuonikanylointiin. Lääkeaineen annostelu hiiren painoon suhteutettuna onnistuu tällä menetelmällä myös varsin tarkasti. Oletuksena oli, että hiiret sietävät varsinaista pistochoitoa hyvin, kun kuljetinaaineena on fysiologinen suolaliuos. Alkuvaiheessa XAV-939:n liukoisuus suolaliuokseen todettiin huonoksi. Tyypillisesti tutkimuksissa XAV-939 kuljettimena on käytetty 10% DMSO -liuosta. Näissä tutkimuksissa on kuitenkin lähinnä käytetty aikuisia hiiriä ja Farmagologian laitoksen neonataalihiiriä käyttävän tutkimusryhmän tietojen mukaan neonataalihiirten sietokyky DMSO:n suhteen on huono. Julkaisuja aiheesta ei ole ja tieto oli peräisin toiselta tutkimusryhmältä, joka käyttää samoja hiiriä. Ilmeisesti IP-annosteltu 10% DMSO aiheuttaa vielä kasvuvaiheessa oleville hiirille kiinnikkeitä sisäelinten välille. Päädyttiin kokeilemaan XAV-939:n liukoisuutta kemiallisesti inaktiivisempaan maapähkinäöljyyn. Koska liukoisuus todettiin hyväksi, edettiin hiirikokeisiin. Oletuksena oli että, energiaa sisältävä maapähkinäöljy mahdollisesti lisää hiirten painoa verrokkiryhmään nähden.

Toiseksi tutkimuskysymykseksi muodostui aiheuttaako XAV-939:lla annettu pistochoito muutoksia neonataalihiirten sydämien mitokondrioiden hapenkulutuksessa tai histologiassa. XAV-939:n on havaittu nostavan kohdesolussa akksiinipitoisuuksia, jonka seurauksena mitokondrioissa tapahtuvan oksidatiivinen fosforylaation on havaittu soluviljelmissä toimivan matalammalla tasolla. Tämä on liitetty elektronisiirtoketjussa kompleksi IV:n toiminnan aktiivisuuden laskuun(15). Oletuksena oli täten, että jos lääkeaine saavuttaa kohdesolut riittävässä määrin, se voitaisiin havaita mitokondrioiden toiminnan analyysissä. Aiemmissa tutkimuksissa on käytetty erilaisia annoksia. Wang ym. (2014) tutkimuksessa annettiin aikuisille hiirille 5mg/kg kerran päivässä intraperitoneaalisesti.(18) Kyseisellä annoksella saatiin lisättyä hiirten selviytymistä kemiallisesti aiheutetusta keuhkovauriosta. Yao ym. (2017) käyttivät annosta 2.5 mg/kg kerran päivässä ja Distler ym. (2012) injektioi tutkimuksessaan 2.5 mg/kg neljästi päivässä.(20)(21) Päädyttiin käyttämään 10mg/kg kerran vuorokaudessa. Kerta-

annostelun ja ison annoksen avulla haluttiin erottaa neonataalihiiret emostaan mahdollisimman harvoin, mutta varmistaa, ettei annos jää liian pieneksi.

Siitä minkälainen vaikutus XAV-939:llä on neonataalihiirten sydänekudoksen histologialle, ei ole julkaisuja. XAV-939:n on havaittu hidastavan solujakautumista, hillitsevän erilaistumista ja toisaalta edistävän kardiogeneesiä. (18) Ennakkoon ei ollut pääteltävissä minkä suuntaisia lääkkeen aiheuttamia muutoksia kasvavan hiiren histologiassa voisi näkyä. Mahdollisia eroja lääkettä saavan ryhmän ja kontrolliryhmän ns. normaalihistologian välillä etsittiin jakautumisvaiheessa olevien solujen määrästä, solukoosta, morfologiasta sekä sidekudoksen laadusta ja määrästä.

4 Tutkimusaineisto ja menetelmät

Aineisto kerättiin kesän 2015 aikana. Aineisto koostuu kahdeksasta hiiripesueesta, jotka on nimetty A-H, ja näihin kohdistuneista tutkimuksista ja mittauksista. Tutkimukseen kelpaavia poikasia syntyi yhteensä 104 kappaletta. Näistä 102 oli elossa ja tallella hoitojen loppuessa. Yksi kuoli ja yksi katosi. Yhtä poikasta A-pesueesta ei otettu mukaan aineistoon, koska se oli jo syntyessään muita puolta pienempi eikä lähtenyt kasvamaan. Se olisi ollut A-pesueen yhdestoista poikanen, eikä se näy raportin luvuissa.

Hiirten toimittajana oli Harlan Laboratories ja kantanimenä Hsd:ICR (CD-1®). Hiiriemot toimitettiin tiineinä. Emoja hoidettaessa tarkistettiin aamuisin, onko emo synnyttänyt. Jos synnytys havaittiin silloin, tutkimuksen hoidot aloitettiin poikasille samana aamuna. Jos synnytys havaittiin myöhemmin päivän tai illan aikana, hoidot aloitettiin seuraavana aamuna. Hoitoja annettiin seitsemänä päivänä kerran vuorokaudessa.

Hoitona oli vatsakalvonsisäiset injektiot ja ne annettiin aamuisin. Puolet poikueista (poikueet B, D, E ja H) toimivat kontrolleina ja ne saivat kuljetinainetta ilman vaikuttavaa ainetta XAV-939:ää. Lääkeryhmästä osa sai injektiossa XAV-939-yhdistettä liuotettuna fysiologiseen suolaliuokseen (poikue A) ja osalle (poikueet C, F ja G) yhdiste annettiin liuotettuna maapähkinäöljyyn. Hiiret lopetettiin seitsemän päivän ikäisinä noin puolilta päivin, jonka yhteydessä niiden sydämet irrotettiin. Osasta sydämistä määritettiin mitokondrioiden toimintafunktio Oxygraph k2 -laitteella. Osa sydämistä meni histologisiksi näytteiksi ja loput sydämet jäädytettiin ja varastoitettiin mahdollisia myöhempiä PCR-määrittystä varten.

4.1 Hoidon valmistelut

XAV-939 oli pitkäaikaissäilytyksessä jauheena -20 °C:ssa. Käyttöönoton yhteydessä sen annettiin lämmetä huoneenlämpöiseksi 20 min, jonka jälkeen sitä punnittiin 4,00 mg ja yhdistettiin 10 ml:aan kuljetinainetta. Näin ollen yksi 25 µl injektio, joka oli 1g painavan hiiren päiväannos, valmista seosta sisälsi lääkettä 0,01mg. Tasaisen pitoisuuden

varmistamiseksi seosta sisältävää koeputkea sonicoitiin 15 minuuttia 37°C vedessä ennen säilömistä.

Käytettyä 0,9 % NaCl liuoksen ja XAV-939:n seosta valmistettiin kerran. Valmis seos jaettiin kymmeneen osaan ja laitettiin säilöön -80°C pakastimeen. Hoitokerran yhteydessä sulatettiin tarvittava määrä annoksia. Pakasteet sulatettiin vesihauteessa ja seoksia sekoitettiin vielä koeputkiravistelijassa ennen ruiskuun vetämistä. Käyttämättä jäänyt seos tuhottiin. XAV-939 liukenevuus suolaliuokseen havaittiin huonoksi ylimääräisestä 90min sonicoinnista huolimatta. Koeputken pohjalle kertyi noin viiden minuutin kuluessa sakkaa, joka saatiin koeputkiravistelulla taas hetkeksi silmämääräisesti katomaan ennen injektion antamista. Suolaliuoksen käyttäminen lopetettiin A ja B pesueiden jälkeen. Hoitoja jatkettiin käyttämällä kuljetinaaineena maapähkinäöljyä.

Maapähkinäöljyn ja XAV-939:n seosta valmistettiin useammassa erässä hävikin vähentämiseksi. Sakkautumista ei havaittu missään vaiheessa. Erät pakastettiin heti valmistamisen jälkeen, mikäli valmistettu annos ei ollut menossa käyttöön seuraavan kolmen päivän kuluessa. Jos valmistettu annos oli tarkoitus käyttää seuraavan kolmen vuorokauden aikana, sitä säilytettiin jääkaapissa. Samoin hoitokerroilta yli jääneitä seoksia säilytettiin enintään kolme päivää sulaneena jääkaapissa. Annettaessa vain maapähkinäöljyä ilman lääkettä öljyä ei pakastettu.

4.2 Hiirten hoito ja lopetus

Hiirten syntymän jälkeen niitä hoidettiin vatsakalvon alle annettavalla injektioilla kerran päivässä seitsemän päivän ajan. Ensimmäinen hoito annettiin yhden vuorokauden iässä ja viimeinen seitsemän vuorokauden iässä. Hoidon alussa hiiret punnittiin ja sen perusteella määräytyi annoksen koko taulukon 1 mukaisesti. Läkettä annettiin 10mg/kg. Useimmiten aloitusannos oli 50µl ja viimeisen päivän annos 125µl. Suurimmillaan annos oli 150 µl ja pienimmillään 25 µl. Hoito suoritettiin yleensä aamulla, mutta viimeistään kello 14.00 mennessä.

Taulukko 1. Tutkimuksessa annetut injektiohoitojen tilavuudet ja lääkeannokset painon mukaan. Hiirien saaman injektion tilavuus kasvoi hiiren kasvaessa. Lääkeannos kiloa kohden pidettiin samana. Kontrolliryhmälle annetun injektion tilavuus laskettiin samalla ohjeella.

Hiiren paino (g)	Injektion tilavuus (µl)	injektion lääkepitoisuus (mg/ml)	lääkeannos (mg)	lääkeannos (mg/kg)
1	25	0,4	0,01	10
2	50	0,4	0,02	10
3	75	0,4	0,03	10
4	100	0,4	0,04	10
5	125	0,4	0,05	10
6	150	0,4	0,06	10

Injektio annettiin insuliiniruiskulla, jossa oli 30G:n neula. Hoitoja varten koko poikue erotettiin emostaan yhtä aikaa ja palautettiin taas yhdessä erässä. Hoitokerta kesti noin 20 minuuttia. Hoitojen välillä ne saivat olla emonsa kanssa samassa häkissä ilman erityisempiä häiriöitä. Annetun injektion sisältö vaihteli poikueittain taulukon 2 mukaisesti.

Taulukko 2. Tutkimuksessa annettujen injektiohoitojen sisällöt poikueittain. Taulukosta nähdään myös poikueiden koot merkattuna sulkuihin poikueen kirjainnimen jälkeen. Koko poikue sai aina samaa hoitoa.

Poikue	Kuljetin	Määrä	XAV-939 pitoisuus injektiossa	XAV-939 päiväannos
A (10)	0,9% NaCl	25 µl/g	0,4 mg/ml	10 mg/kg
B (13)	0,9% NaCl	25 µl/g	-	-
C (16)	Peanut oil	25 µl/g	0,4 mg/ml	10 mg/kg
D (14)	Peanut oil	25 µl/g	-	-
E (12)	Peanut oil	25 µl/g	-	-
F (9)	Peanut oil	25 µl/g	0,4 mg/ml	10 mg/kg
G (13)	Peanut oil	25 µl/g	0,4 mg/ml	10 mg/kg
H (15)	Peanut oil	25 µl/g	-	-

Hiiret lopetettiin seitsemäntenä päivänä. Lopetuspäivän aamulla edelleen hoidettiin koko poikue kerralla ja palautettiin kaikki emon luo. Lopetusta varten poikasia haettiin emon

luota osissa. Hiiret lopetettiin leikkaamalla pää irti nopeasti saksilla. Seuraavaksi irrotettiin ja punnittiin sydän ja sen jatkokäsittely riippui valitusta tutkimuksesta taulukon kolme mukaisesti. Sukupuoli tarkistettiin vatsaontelosta munasarjojen löytymisen perusteella. Sydämet koodattiin seurantaan varten kirjainten ja numeron yhdistelmällä. Kirjain tuli pesueen mukaan ja numerot jaettiin lopetus järjestyksessä. Perään lisättiin F tai M sukupuolen mukaan.

Taulukko 3. Hiirten sydämien sijoittelu. Sydämistä 28 meni Oxygraph laitteen mitokondriofunktio määrittämiseen, 32 meni histologisiksi näytteiksi. Loput 42 sydäntä pikajäädystettiin nestetypessä ja säilöttiin -80 °C pakastimeen. Sydänten sijoitukseen vaikutti sukupuoli ja saatu hoito. Kaikkiin tutkimusryhmiin haluttiin molempia sukupuolia mahdollisimman tasaisesti.

Sijoitus	sukupuoli	Tutkimusryhmät saadun hoidon mukaan			
		0,9%NaCl	0,9%NaCl + XAV-939	Peanut oil	Peanut oil + XAV-939
OXYGRAPH 28kpl	F	B1, B4	A1, A2, A3	D2, D3, H3, H4	C1, C4, F4, G1, G2, G3
	M	B3, B2	A4	D1, D4, H1, H2	C2, C3, F1, F2, F3, G4
HISTOLOGIA 32 kpl	F	B6, B9	A8, A10	D14, E5, E7, E8, E10, E11	C5, C6, C7, F6, F7, G6
	M	B5, B7, B8	A9	D12, D13, E4, E6, E9, E12	C8, C9, C10, F5, F8, F9
PAKASTUS 42kpl	F	B12, B13	A7	D7, D10, D11, E1, E3, H11, H13	C11, C12, C13, C14, C15, C16, G9, G11, G13
	M	B10, B11	A5, A6	D5, D6, D8, D9, E2, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H12, H14, H15	G5, G7, G8, G10, G12

4.3 Mitokondrioiden hapenkulutuksen määrittäminen oxygraph k2-laitteella

Aineenvaihdunta analyysiin menevä sydän upotettiin punnituksen jälkeen jäissä olevaan BIOPS liuosta sisältävään koeputkeen. BIOPS-liuos (10 ml) koostui 10 mM Ca-EGTA:sta, 0.1 µM vapaasta kalsiumista, 20 mM imidatsolista, 20 mM tauriinista, 50 mM kalium 4-morfolinetaanisulfonihaposta, 0,5 mM ditiotreitolista (DTT), 6,56 mM magnesiumkloridista (MgCl₂), 5,77 mM ATP:stä ja 15 mM fosfokreatiinista. (22) BIOBS liuoksessa olevasta sydäimestä leikattiin käsityönä pala ja punnittiin Mettler AE240 vaa'alla se mahdollisimman tarkasti 4,00g painoiseksi. Kyseinen kudospala

homogenisoitiin PBI shredder SG3- laitteella ja laimennettiin MiRO6 liuoksella, jonka jälkeen siitä arvioitiin mitokondrioiden oksidatiivisen fosforylaation toimintaa mittaamalla näytteen hapenkulutuksen muutoksia Oroborosin Oxygraph 2k laitteella. Tässä tutkimuksessa käytettiin Oroborosin glukoosi substraatti-irtikytkijä-inhibiittori-titraatio (SUIT) protokola. Menetelmä on kuvattu tarkasti Henri Vartiaisen opinnäytetyössä: Uudet lääkeaineet akuutin sydämen vajaatoiminnan hoidossa, Helsingin yliopisto, Farmakologian laitos 2014.

SUIT-protokolassa shredderillä homogenisoitu näyte pipetoidaan Oxygraph 2k analyysikammioon. Laite mittaa kammion happipitoisuutta ja laskee hapenkulutusta (FLUX). Kammioon syötetään aluksi happea niin, että pitoisuus nousee noin 400nmol/ml, jonka jälkeen kammio suljetaan. Jos happipitoisuus laskee kammiossa analyysin aikana liian matalaksi, sinne voidaan lisätä vetyperoksidia (H_2O_2), joka hajoaa MIRO6 liuoksessa olevan katalaasin vaikutuksesta vedeksi ja hapeksi. Kammioon pipetoidaan seuraavaksi järjestyksessä malaatti, pyryvaatti, glutamaatti, ADP+Mg, sytokromi-c, sukkinaatti, FCCP, rotenoni, malonihappo, antimysiini-A. Laite laskee koko ajan FLUX arvoa ja piirtää siitä kuvaajaa.(22)

Malaatin, pyryvaatin, glutamaatin lisäämisen jälkeinen FLUX arvo kertoo, kuinka paljon happea kuluu ilman, että ATP synteesi on käynnissä. Tämä esitetään tuloksissa LEAK arvona. ADP+Mg lisäys käynnistää kompleksi I:stä rippuvaisen oksidatiivisen fosforylaation ja se on merkattu tuloksiin CI:nä. Sytokromi-C lisäys paljastaa kuinka paljon mitokondrioiden ulkokalvoista on vaurioitunut. Jos kaikki ulkokalvot olisivat ehjiä lisäys ei muuttaisi FLUX arvoa lainkaan. Tämä vaihe on tuloksissa merkattu koodilla CI+Cyt-c. Sukkinaatin lisääminen stimuloi kompleksi II:sta ja sen lisäämisen jälkeinen FLUX arvo on tuloksissa merkattu koodilla CI+CII. FCCP on irtikytkijä ja sen lisääminen vapauttaa elektronisiirtoketjun toimimaan maksiminopeudella. Vaihe on merkattu tuloksiin lyhenteellä CI+CII+ETS. Rotenoni inhiboi CI:n toiminnasta riippuvaisen osuuden ja jäljelle jäävä hapenkulutus on CII:sta riippuvainen osuus. Rotenonin lisäämisen jälkeinen hapenkulutus on tuloksissa merkattu CII+ETS. Malonihappo inhiboi CII:sta ja antimysiini-A inhiboi CIII:sta, joiden lisääminen kammioon lopettaa elektronisiirtoketjun toiminnan. Jäljelle jäävä hapenkulutus kuvaa yhdisteessä tapahtuvia

muita kuin elektronisiirtoketjun aiheuttamia happea kuluttavia reaktioita. Tämä peruskulutus vähennetään muista arvoista, jolloin ne kuvaavat tarkemmin mitokondriotoimintaa.(22)

Koska näytteeseen ei voitu täysin luotettavasti mitata samaa määrää mitokondrioita, analyysistä saadut mitokondriofunktokäyrät suhteutettiin toisiinsa niin, että korkein kohta (ETS) sai arvon 1 ja muut arvot ilmoitetaan osuuksina tästä. Mitokondrioiden toimintafunktioista etsittiin eroja eri hoitoa saaneiden ryhmien välillä vertailemalla kompleksien saamia suhdelukuja ja kuvaajien muotoa. Tilastollinen merkitsevyys tarkistettiin Excel taulukko-ohjelman T-testillä.

4.4 Histologisten näytteiden käsittely ja analysointi

Histologiaan menevä sydän halkaistiin punnituksen jälkeen septumin suuntaisesti sydämen kärjen eli apexin kautta, laitettiin asiaankuuluvaan rasiaan ja upotettiin formaliiniin fiksoitumaan. Näytteistä teetettiin anatomian laitoksella ostopalveluna leikkeitä, joista osa värjättiin HE-värjäyksellä. HE-värjätyt sydänleikkeet skannattiin 40x suurennoksella mrxs- kuvatiedostoksi. Histologisten näytteiden kuvatiedostoja analysoitiin IMAGE J FIJI ohjelmalla. Näytteistä etsittiin eroja normaalihistologiaan ja mahdollisia eroja hoitoryhmien väliltä. Arvioitiin sidekudoksen määrää ja laatua sekä jakautumisvaiheessa olevien solujen määrä, solukokoja ja morfologiaa. Kuvien analysoinnissa käytettiin hyväksi yliopistolehtori Piet Finckenbergin asiantuntemusta ja kokemusta Helsingin Yliopiston Farmakologialta.

4.5 Statistiikka

Numeerisia tuloksia arvioitiin Excel taulukko-ohjelmalla. Tuloksissa esitetyt pylväät ovat keskiarvoja (MAEN) ja niiden päällä on graafisesti lisätty keskihajonta (+/-STDEV). Tilastollisen merkitsevyyden rajana käytettiin $P < 0,05$. P-arvot laskettiin Excelin T-testillä, jossa funktio käyttää kaksisuuntaista jakaumaa ja jossa varianssit oletettiin erisuuriksi (heteroskedastinen)

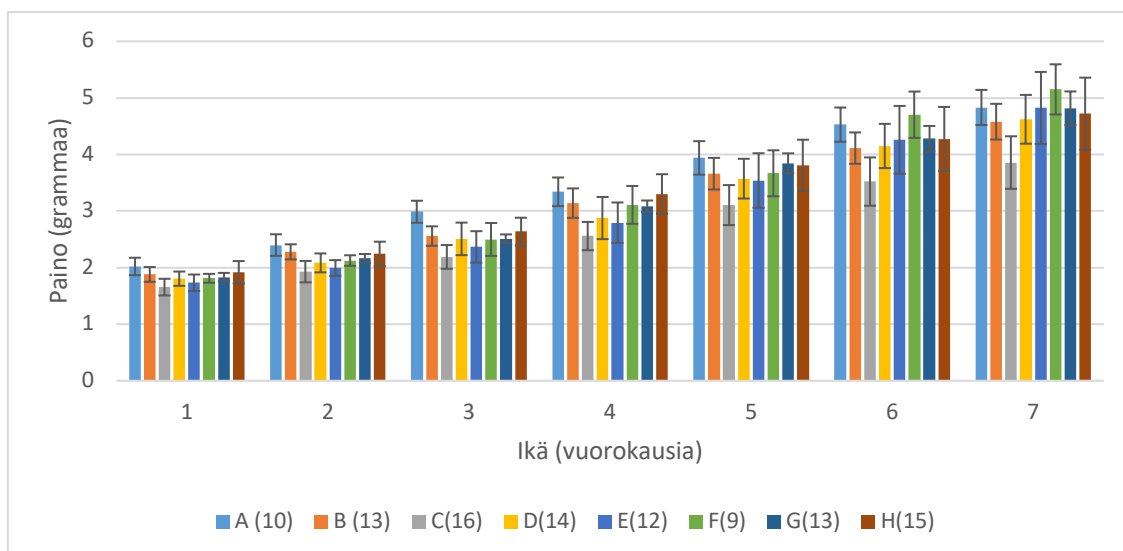
5 Tulokset

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää miten neonataalihiiret sietävät injektioina vatsakalvon sisään annettua Wnt- inhibiittorihoitoa. Wnt- inhibiittorina toimi XAV-939 yhdiste. Lisäksi tavoitteena oli selvittää aiheuttaako XAV-939 muutoksia neonataalihiirten sydänten mitokondrioiden hapenkulutuksessa tai histologiassa. Tutkimusryhmiä muodostui neljä saadun injektiohoidon mukaan: NaCl, NaCl+XAV, Oil ja Oil+XAV.

5.1 Hoidon sieto ja vaikutus hiirten kasvuun

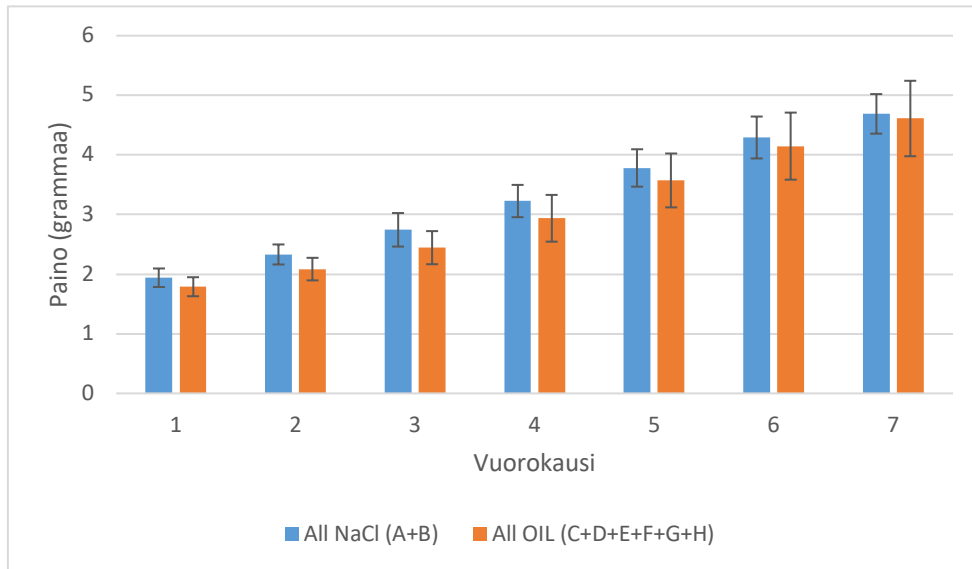
Poikaset sietivät hoitoa hyvin. Yhteensä hoitoa sai 104 poikasta kahdeksasta poikueesta. Yksi poikanen F-pesueesta katosi kolmannen ja neljännen hoidon välissä jälkiä jättämättä, mahdollisesti emo oli syönyt sen. Yksi poikanen G-pesueesta löytyi kuolleena häkistä kolmantena päivänä. Kuolinsyy jäi epäselväksi.

Pesueiden välillä havaittiin ero painon kehityksessä pesueen koon mukaan. Pesue C, jossa oli eniten poikasia (16), kehittyi muita hitaammin. Pesueeseen F, jossa oli vähiten poikasia (9), taas kehittyi tutkimuksen painavimmat yksilöt. Pesueiden A-H päivittäin lääkityksen yhteydessä mitatut painot on piirretty keskiarvoina kuvaan 3.



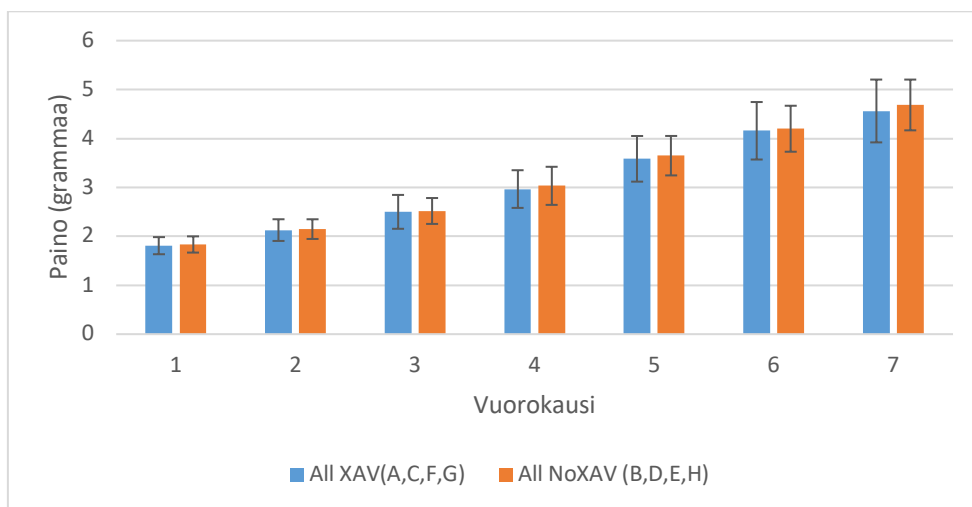
Kuva 3. Tutkimuksessa hoidettujen hiiripoikueiden painon kehittyminen pesueittain. Tolpan korkeus on kunkin pesueen poikasten painon keskiarvo aamuisin. C poikue oli isoin (N=16) ja siinä oli keskimäärin pienimmät poikaset alusta loppuun. F poikue oli pienin ja siihen kehittyi keskimäärin painavimmat yksilöt.

Kun hiiret jaetaan kahteen ryhmään annetun kuljetinaineen mukaan ja tarkastellaan painoa seitsemännen vuorokauden kohdalla, ei huomata tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä ($P=0,433$). Ryhmien päivittäinen painon kehitys on esitetty kuvassa 4. Annetun kuljetinaineen valinta ei siis vaikuttanut hiirten painoon.



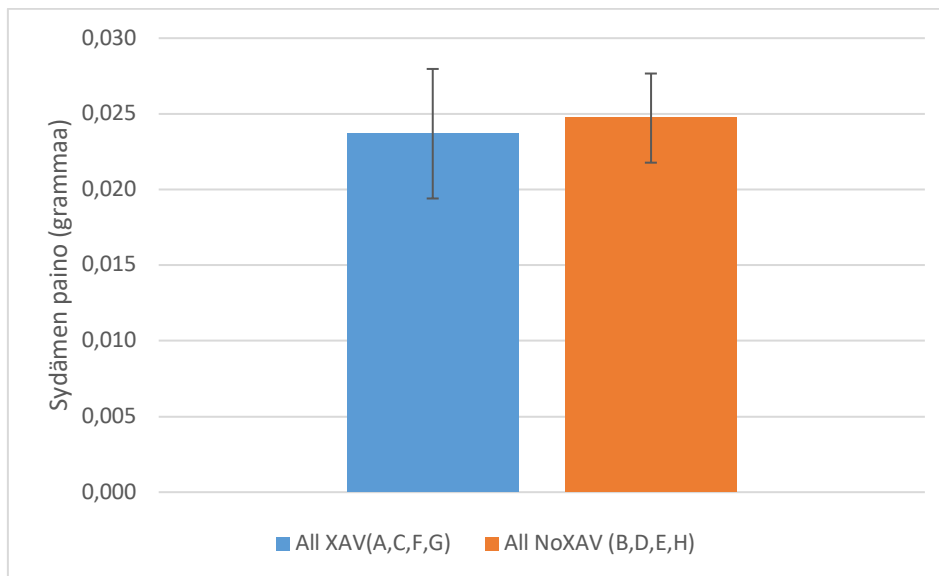
Kuva 4. Hiirten keskiarvopainot kuljetinaineryhmittäin. Eroa fysiologiesella suolaliuoksella hoidettujen ja maapähkinäöljyllä hoidettujen välille ei syntynyt.

Kun vertaillaan kaikkia XAV-939:ä saaneita, pelkkää vehikkeliä saaneisiin, ryhmien välinen ero ei ole tilastollisesti merkitsevä seitsemännen päivän kohdalla ($P=0,290$). Painon kehitys hiiret ryhmiteltynä hoitoa ja lumehoitoa saaneisiin on esitetty kuvassa 5. XAV-939:n antamisen ei havattu vaikuttavan painoon seitsemännen vuorokauden kohdalla.



Kuva 5. Lääkeainetta saaneiden hiirten päivittäinen keskiarvopaino vertailussa kontrolliryhmän keskiarvopainoon. Eroa ryhmien välille ei syntynyt.

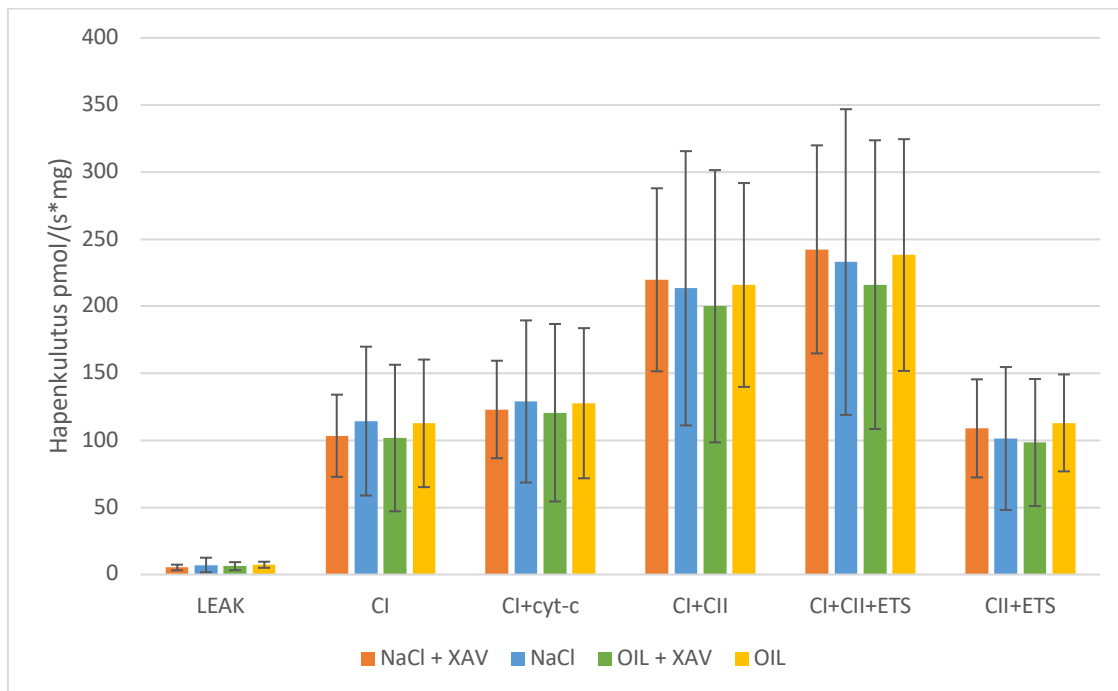
Hiirten sydämet punnittiin lopettamisen yhteydessä. Tutkimuksen ensimmäisen hoidetun pesueen A sydämien painot punnittiin vain hiiristä A5-A10. Mitokondrioanalyysiin menevät sydämet jäivät siis ensimmäisestä pesueesta epähuomiossa punnitsematta. Kun punnitut sydämet ryhmitellään XAV-939:ä saaneisiin (N=44) ja vain vehikkeliä saaneisiin (N=54), sydämien painoissa ei havaita tilastollisesti merkitsevää eroa ($P=0,178$). Sydämien painot em. jaolla kuvattuna kuvissa 6.



Kuva 6. Pesueet A, C, F ja G saivat IP-injektion mukana 10 mg/kg XAV-939 molekyyliä. Pesueet B, D, E ja H eivät saaneet pistoksen mukana mitään lääkettä. Tilastollisesti merkitsevää eroa ei syntynyt ryhmien välillä kun, sydämet punnittiin 7vrk kestäneen hoidon jälkeen.

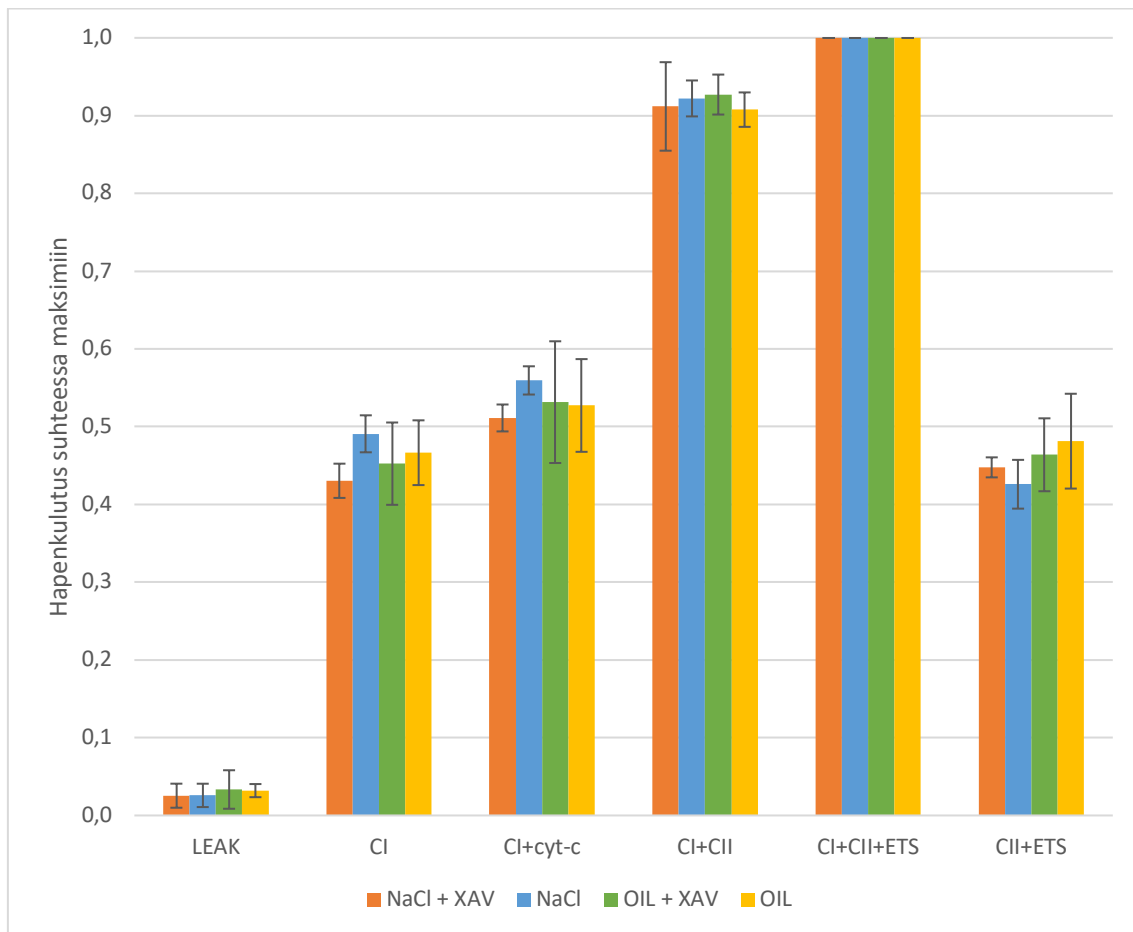
5.2 Hoidon vaikutukset mitokondrioiden toimintaan

Oroboroksen Oksygraph 2k laitteilla tehdyissä kudospäyteanalyysissä mitattiin mitokondriotoimintaa yhteensä 28:sta näytteestä. Mittauksista 25 onnistui. Näytteen B2F mittauksesta ei saatu Flux arvoja piirtymään tuntemattomasta mahdollisesta teknisestä syystä johtuen. Alustamalla laite uudelleen seuraavan mittauksen molempien kammioiden analyysit onnistuivat ongelmitta. Näytteiden F1M ja F2M mittauksessa oli ilmeisesti unohtunut käynnistää shredder laite. Epäilyttäviä tuloksia ihmeteltäessä tarkistettiin kudospalan ulkonäkö ja näyte vaikutti poikkeavalla tavalla intaktilta. Tuloksia ei otettu mukaan aineistoon. Onnistuneille glukoosiprotokollalla tehdyille mittauksille lasketut eri vaiheiden hapenkulutuksen keskiarvot tutkimusryhmittäin on esitetty kuvassa 8. Kun ryhmien saamia arvoja vertailtiin toisiinsa t-testillä P arvot eivät alittaneet 0,05:n rajaa.



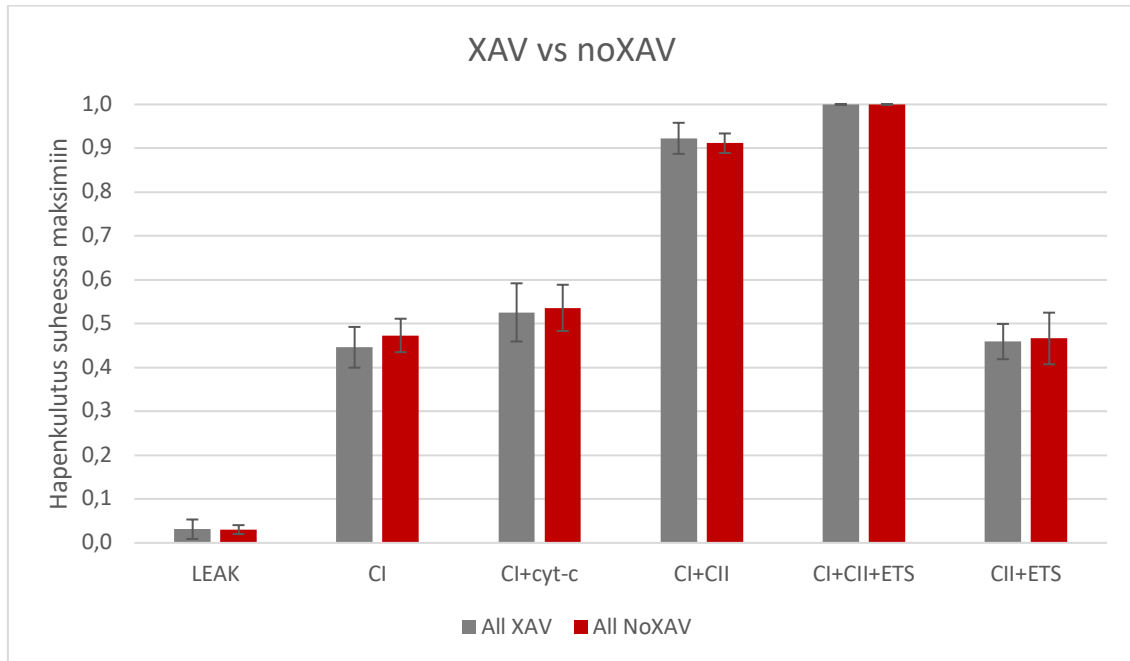
Kuva 7. Tutkimushiirten sydänpalasta erotettujen mitokondrioiden toimintaa kuvaavat hapenkulutus arvot vaiheittain ja tutkimusryhmittäin. X-akselilla esitetyt vaiheet kuvastavat oksidatiivisen fosforylaation vaiheita. Kaikista vaiheista on vähennetty liuoksessa tapahtuva muusta kuin mitokondriosta johtuva hapenkulutus. LEAK arvo kuvastaa mitokondrion sellaista hapenkulutusta, joka ei johdu ATP synteesistä. CI merkin sisältävissä vaiheissa elektronisiirtoketjun kompleksi I on aktiivinen. Vastaavasti CII tarkoittaa kompleksia II. ETS merkki tarkoittaa, että protonit virtaavat vapaasti mitokondrion sisäkalvon läpi. Tämä kiihdyttää hapenkulutuksen maksimiin, vaikkakin ATP synteesi ei toimi enää optimaalisesti. Koska kudospalan mitokondriomäärä on joka kudospalassa eri, on keskihajonnat melko suuria.

Hapenkulutusarvoja suhteutettiin näytteestä mitattuun hapenkulutuksen maksimiin, koska näytteen mitokondriomäärää ei voitu riittävällä tarkkuudella vakioida. Tällä tavalla saadut arvot ovat keskihajonnaltaan paljon pienempiä. Nämä on esitetty kuvassa 9. Pienemmän hajonnan vuoksi saatiin tilastollisesti merkittävä ero fysiologisen suolaliuos ryhmien välille vaiheissa CI($P=0,024$) ja CI+cyt C ($P=0,021$).



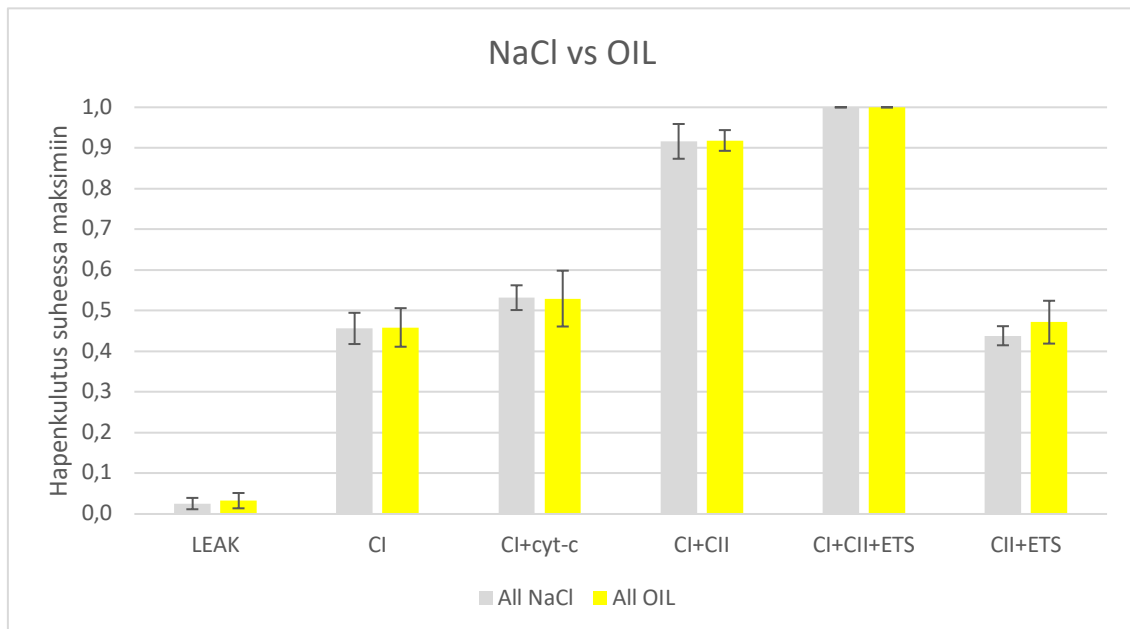
Kuva 8. Oxygraph 2k analyysin kytkentäaste arvot tutkimuslyhmittäin. Toisin sanoen tässä näkyy mitokondrioiden oksidatiivisen fosforylaation toiminta suhteutettuna maksimiin eli vaiheessa CI+CII+ETS mitattuun arvoon. Näin tarkasteltuna keskihajonnat saadaan pienemmiksi kuin kuvassa 5 tehdyssä tarkastelussa. Tilastollisesti merkitsevät erot havaitaan verrattaessa NaCl ja NaCl+XAV ryhmiä toisiinsa vaiheissa CI ($P=0,024$) ja CI+cyt-c ($P=0,021$). Näissä vaiheissa hapenkulutus jää pienemmäksi XAV-939 lääkettä saaneessa ryhmässä.

Tarkastaltaessa XAV-939 molekyyliä saaneita hiiriä kokonaisuutena ja verrattaessa niitä kontrollihiirien kokonaisuuteen ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa oksidatiivisen fosforylaation analyysin missään vaiheessa ($P>0,05$). Em. vertailu on esitetty pylväinä kuvassa 10.



Kuva 9. XAV-939 molekyyliä saaneet ryhmät vertailussa kontrolliryhmiin. Tilastollisesti merkitsevää eroa mitokondrioaineenvaihdunnan oksidatiivisessa fosforylaatiossa ei tule esiin.

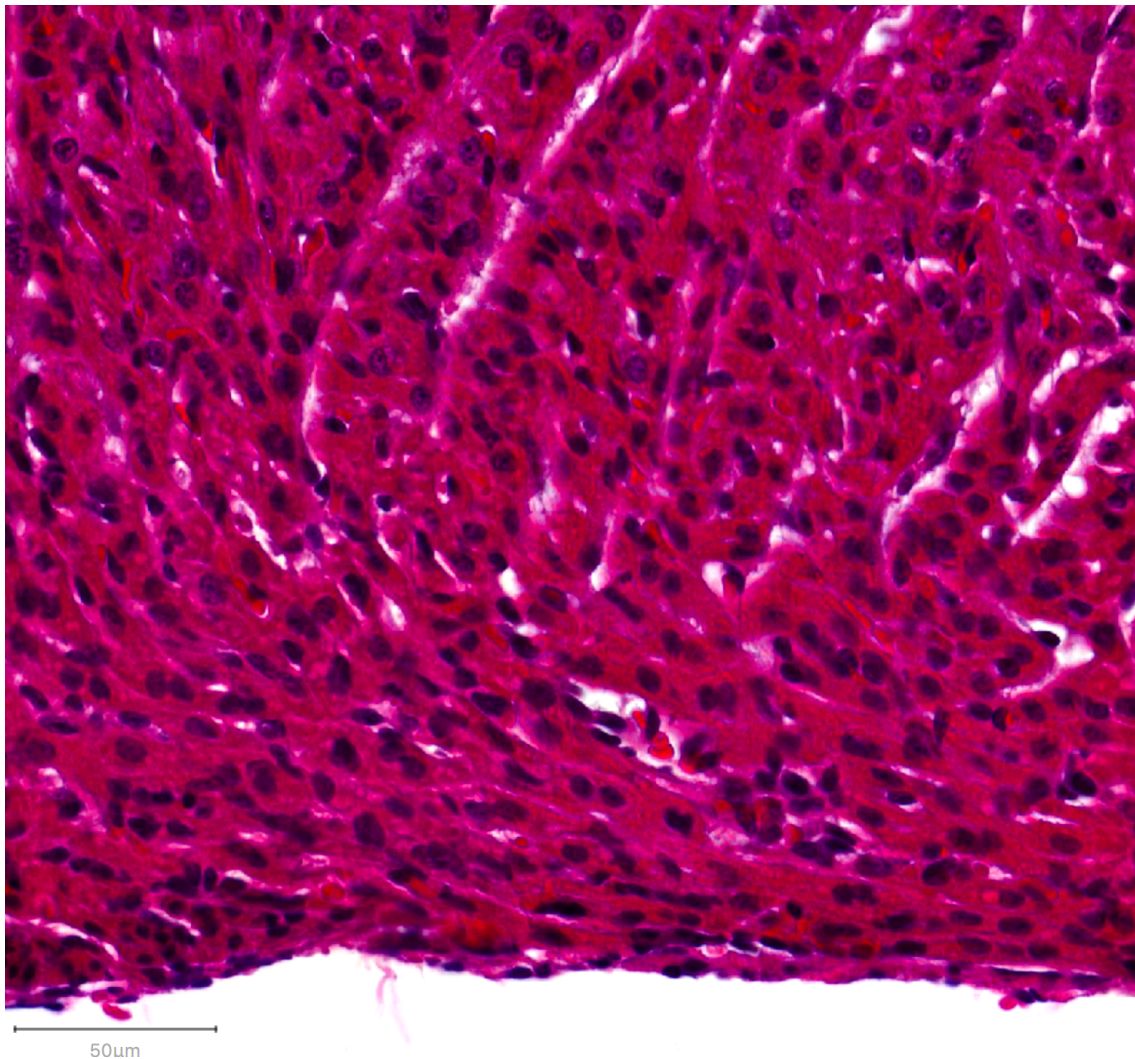
Tarkastelussa, maapähkinäöljyä saaneet vastakkain fysiologista suolaliuosta saaneet, ei myöskään havaittu eroa oksidatiivisen fosforylaation analyysin missään vaiheessa ($P > 0,05$). Vertailu on esitetty kuvassa 11.



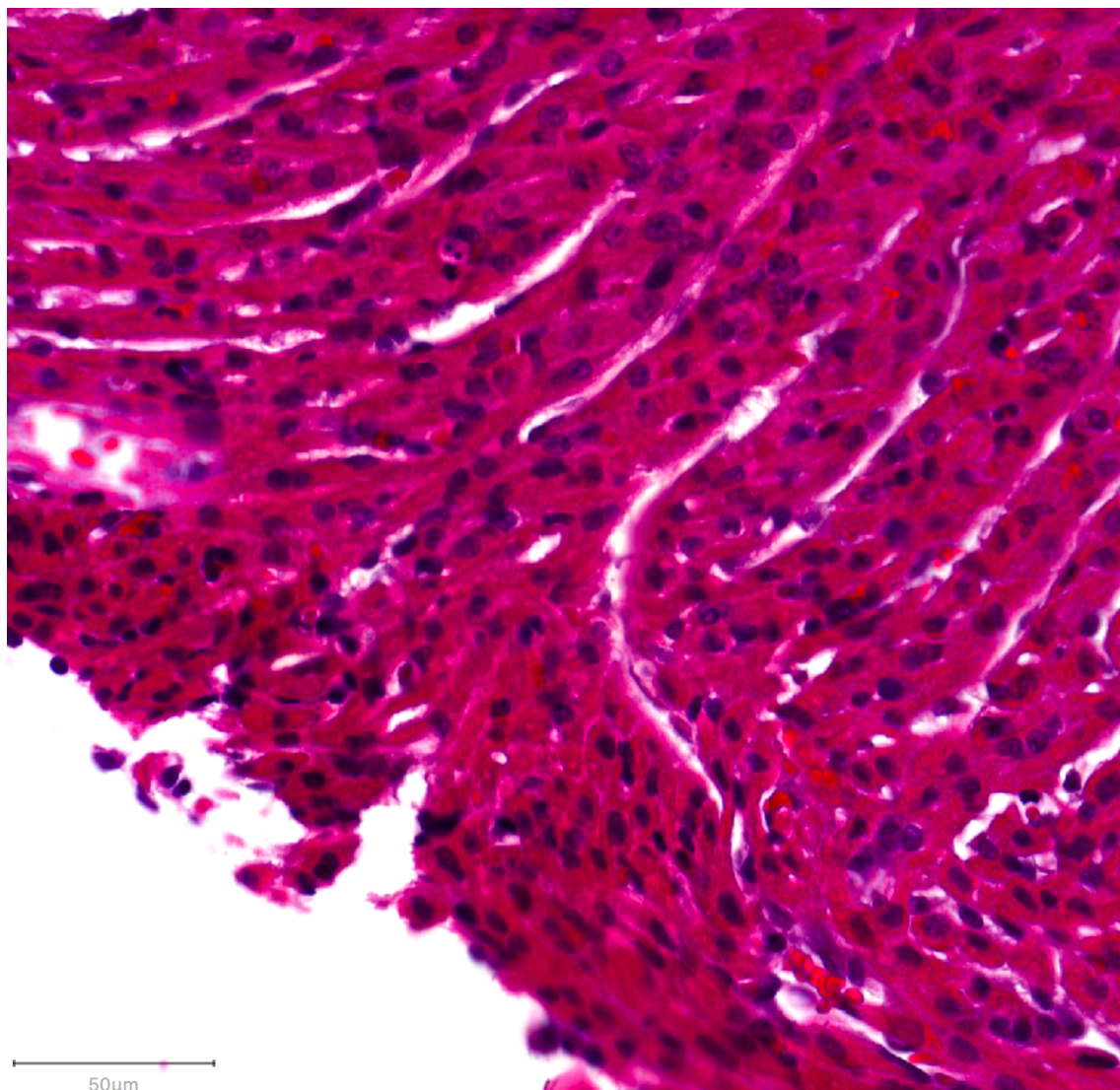
Kuva 10. Tilastollisesti merkitsevää eroa mitokondrioaineenvaihdunnan oksidatiivisessa fosforylaatiossa ei tule esiin myöskään, kun aineisto jaetaan käytetyn kuljetinaineen mukaisiin kokonaisuuksiin.

5.3 Sydänhistologia

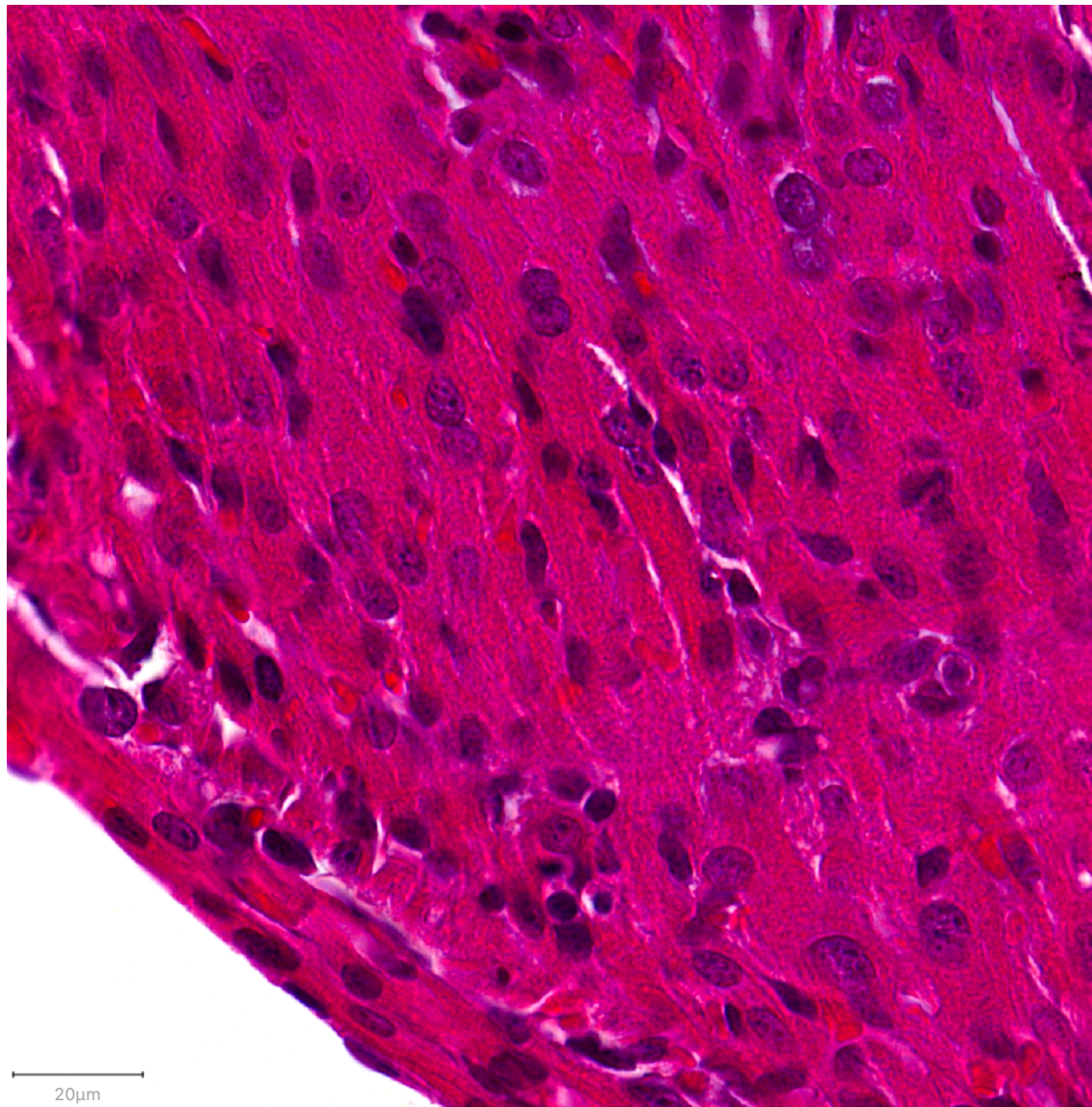
Kaikissa tutkimusryhmissä havaittiin normaalihistologia. HE-värjätty sydänkudos, niin lääkityissä kuin lääkitsemättömissä hiirissä, vastasi toisiaan, oli kuljetinaaineena sitten maapähkinäöljy tai fysiologinen suolaliuos. Yhteensä 32:n hiiren sydäimestä arvioitiin HE-värjätty histologia. Eroja ei havaittu solujen koossa, jakautumisvaiheessa olevien solujen määrässä, sidekudoksen laadussa, sidekudoksen määrässä eikä solujen morfologiassa. Kuvissa 12-15 on näytteet jokaisesta tutkimusryhmästä. Kuvat ovat hiirien sydämien kärjen seudulta.



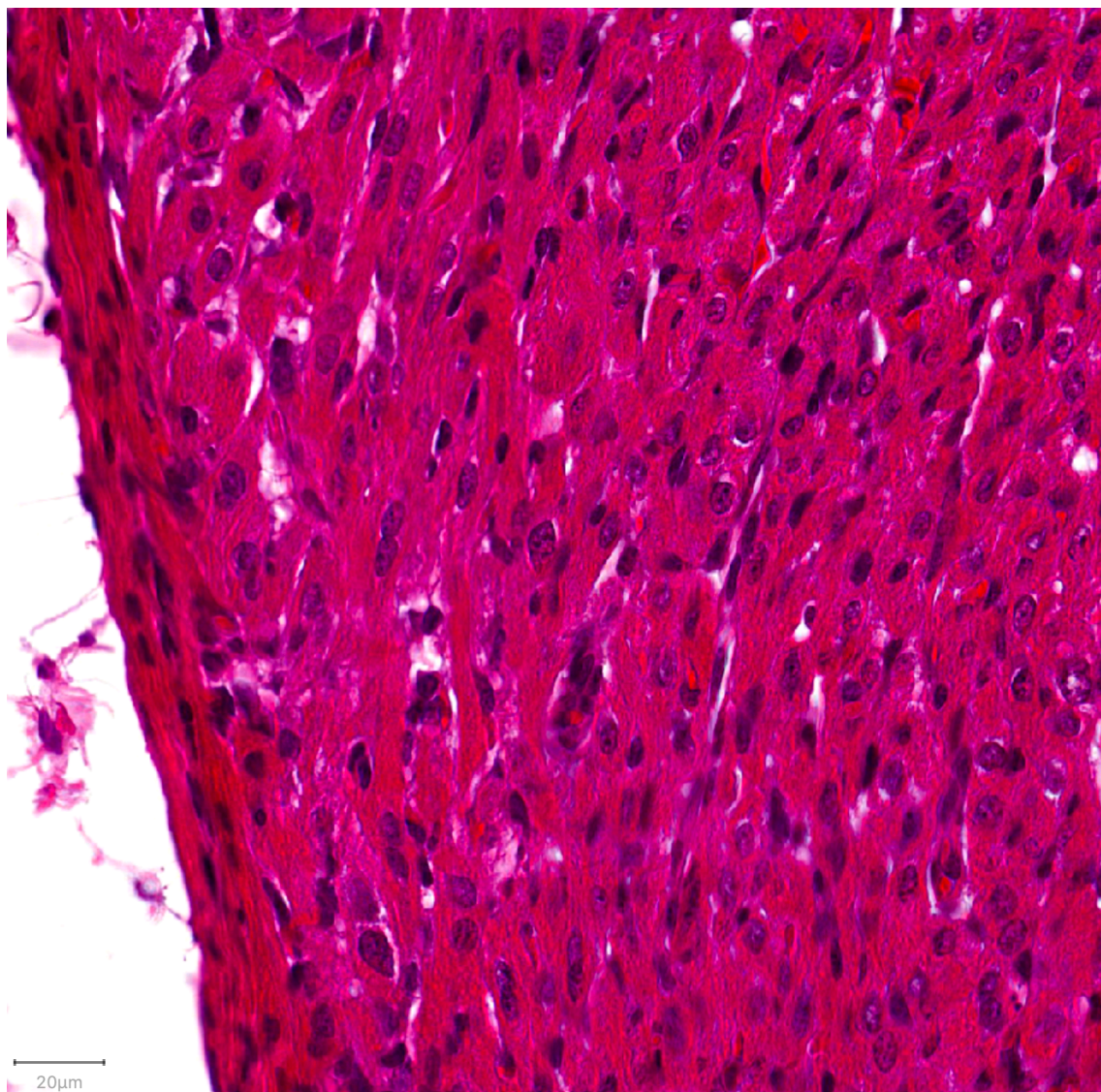
Kuva 11. Hiiren C5F HE-värjätty histologia sydämen kärjen seudusta. Kyseinen hiiri sai IP-hoitona maapähkinäöljyä, jossa 10mg/kg XAV-939:ää.



Kuva 12. Hiiren E12M HE-värjätty histologia sydämen kärjen seudulta. Kyseinen hiiri sai IP-hoitona pelkkää maapähkinäöljyä.



Kuva 13. Hiiren B8M HE-värjätty histologia sydäimestä. Kyseinen hiiri sai IP-hoitona pelkkää fysiologista suolaliuosta.



Kuva 14. Hiiren A10F HE-värjätty sydämen histologia. Kyseinen hiiri sai IP-hoitona fysiologista suolaliuosta, jossa 10mg/kg XAV-939:ää.

6 Pohdinta

Merkittävimpänä tuloksena oli, että sydäninfarktimallin neonataalihiiret sietävät hyvin vatsakalvonalaista pistoksina annettua XAV-939:lla toteutettua Wnt- inhibiittorihoitoa. Yhden hiiren kuoleman syy jäi epäselväksi, mutta sen voidaan olettaa johtuvan hoidosta. Mahdollisesti pistos puhkaisi suuremman verisuonen tai vaurioitti sisäelimiä. Tämän tutkimuksen mukaan kasvavan hiiren HE-värjätty infarktiton histologia ei muutu XAV-939N vaikutuksesta. Hiirten paino ei muutu sen mukaan saako hiiri vatsakalvon alle päivittäin suolaliuosta vai maapähkinäöljyä ($P=0,433$). Muutoksia painoon ei synny myöskään, vaikka vatsakalvon alle lisätään samalla XAV-939:ä ($P=0,290$). XAV-939:n vaikutus sydämen painoon jää myös vailla tilastollista merkitsevyyttä ($P=0,178$)

XAV-939 vaikutus mitokondrioiden toimintaan vaikuttaisi aiempien tutkimusten perusteella olevan oxidatiivista fosforylaatiota inhiboivaa. Tässä tutkimuksessa tämän suuntainen tilastollisesti merkitsevä vaikutus havaittiin vain, kun verrattiin fysiologinen suolaliuos ja fysiologinen suolaliuos+XAV-939 - tutkimusryhmiä toisiinsa. Tilastollisesti merkitsevä ero tuli esiin mitokondrioanalyysin vaiheissa CI($P=0,024$) ja CI+cytC ($P=0,021$). Tästä voisi periaatteessa päätellä, että lääke siirtyi verenkiertoon paremmin suolaliuoksesta kuin maapähkinäöljystä. Tämä ei kuitenkaan ole erityisen vahva päätelmä, koska liukoisuusongelmien takia suolaliushoitoa saaneiden mitokondriofunktiota tutkittiin onnistuneesti vain seitsemältä hiireltä. Neljältä XAV-939 kanssa ja kolmelta ilman XAV-939:ä. Tämä johtui siitä, että XAV-939:n liukoisuuden veteen tiedettiin alunperin olevan $<1\text{mg/ml}$ eikä tarkempaa tietoa ei ollut saatavilla. Kokeilussa todettiin, että fysiologisessa keittosuolassa $0,4\text{mg/ml}$ oli vielä vahvuus, jossa sekoituksella sakka saadaan kyllä näkymättömiin, mutta seisottamisen jälkeen sakka palaa pian nesteen pohjalle. Samaan hetkeen kokeilujen kanssa oli juurisyntyneitä hiiriä tarjolla. Niinpä suboptimaalista pistoshoitoa päädyttiin antamaan ja annettaessa huolehdittiin, että ruiskutettava annos oli sekoitettu hyvin. Tästä huolimatta annettua pitoisuutta ei voida pitää luotettavana suolaliuosryhmän kohdalla.

Hiirien lopetuksen yhteydessä tarkistettiin sukupuoli vatsanpeitteet avaamalla. Tässä yhteydessä havaittiin ero suolaliuosta ja maapähkinäöljyä saaneen ryhmän välillä. Öljyä

saanut ryhmän sisäelimet olivat vatsaontelossa öljyisempiä ja vatsaa avatessa öljyä valui jopa pöydälle. Suolaliuosryhmältä ei valunut vastaava määrää vetistä nestettä. Tämä ei kuitenkaan vaikuttanut vastoin odotuksia hiirten painoeroon. Öljyn näkyminen avauksessa tarkoittaa kuitenkin sitä, että ainakin osa lääkkeestäkin oli vielä vatsaontelon sisällä eikä verenkierrossa. Vastaavaa XAV-939:n vaikutusta oksidatiiviseen fosforylaatioon ei havaittukaan, kun lääke annettiin maapähkinäöljyn seassa.

Lääkkeen siirtyminen IP-tilasta vereen ja todellinen pitoisuus verenkierrossa kaikissa tutkimusryhmissä jäi lopulta epäselväksi. Tuloksista ei siis voida tehdä johtopäätöstä, että annettu XAV-939 ei vaikuta neonataalisydämiin kehitykseen, koska löydösten puuttuminen voi johtua myös siitä, että lääkettä ei kulkeutunut sydämeen. Yksi viitteellinen löydös suolaliuksen paremmuudesta lääkkeen saamiseksi vereen jäi heikoksi pienen otoksen takia. Tulosten yleistettävyyttä heikentämässä on myös käytetty HE-värjäys. HE-värjäyksen sopivuutta tämän tyyppiseen analyysiin pohdittiin jo tutkimuksen alussa. Se oli kuitenkin sopivin niistä, jotka olivat saatavilla laboratoriotyöskentelyn aikana. Vaikutus proliferaatioon näkyisi paremmin esimerkiksi KI-67 antigeeni värjäyksellä.

XAV-939:n liukoisuus 10% DMSO:hon tiedetään riittäväksi. Tutkimusryhmässä oltiin tutkimuksen alussa siinä käsityksessä, että DMSO:n käyttö aiheuttaa liikaa kudonsvaurioita kasvavalle hiirelle. Julkaisuja aiheesta ei ole käytettävissä. Päädyttiin mieluummin selvittämään maapähkinäöljyn soveltuvuutta kuljetinaineeksi. Tähän XAV-939:n liukoisuus oli riittävä. Olisi hyvä selvittää ja mielellään julkaista, kuinka vahvaa DMSO liuosta neonatalihiiret kestävät. Jos sitä voitaisiin käyttää, vertailtavuus aiempiin tutkimuksiin kasvaisi.

Varsinaisen analysoidun aineiston lisäksi tutkimuksessa kertyi samalla ylimääräistä aineistoa. Näitä olivat värjäämättömät leikkeet sydämistä sekä pakastetut sydämet. Näistä on mahdollisuus teettää myöhemmissä tutkimuksissa esimerkiksi PCR määrittäksiä ja erilaisia histologisia värjäyksiä. HE-värjätyistä leikkeistä otetut kuvatiedostot on tallennettu ulkoiselle kovalevyille. Edellä mainittuja aineistoja säilytetään Helsingin Yliopistolla Biomedicumissa.

6.1 johtopäätökset

Tuloksia voidaan käyttää pohjana pohdittaessa, edetäänkö tutkimaan XAV-939 yhdisteen vaikutuksia hiirillä, joille aiheutetaan myös infarkti. Kokeellisen sydäninfarktimallin neonataalihiirille voidaan hyvin antaa intraperitoneaalihoitoa. Kun kuljetinaineena käytetään maapähkinäöljyä, jättää se IP-tilan varsin öljyiseksi, mutta neonataalihiiret sietävät silläkin tehdyn hoidon hyvin. XAV-939:n imeytymistä verenkiertoon eri kuljetinvaihtoehtoista on syytä tutkia tarkemmin. Nykyinen kirjallisuusnäyttö aineen vaikutuksista ja XAV-939:n toimittajan (Selleck) ilmoittamat tiedot liittyvät DMSO:n käyttöön. Vaihtoehtoisesti neonataalihiirien sietokyky DMSO-liuokselle tulisi selvittää ja julkaista ennen kuin sen käytöstä näiden hiirien kanssa luovutaan lopullisesti.

Lähdeluettelo

- (1) Airaksinen J, Aalto-Setälä K, Hartikainen J, Huikuri H, Laine M, Lommi J, et al. *Kardiologia*. 3rd ed. Helsinki: Duodecim; 2016.
- (2) Porrello ER, Olson EN. A neonatal blueprint for cardiac regeneration. *Stem Cell Res* 2014 November 01;13(3 Pt B):556-570.
- (3) GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015 January 10;385(9963):117-171.
- (4) Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Kardiologisen Seuran asettama työryhmä. Sydäninfarktin diagnostiikka. Käypä hoito -suositus. 2014; Available at: www.kaypahoito.fi. Accessed 8/13, 2019.
- (5) Mahmoud AI, Porrello ER, Kimura W, Olson EN, Sadek HA. Surgical models for cardiac regeneration in neonatal mice. *Nat Protoc* 2014 February 01;9(2):305-311.
- (6) Lalowski MM, Bjork S, Finckenberg P, Soliymani R, Tarkia M, Calza G, et al. Characterizing the Key Metabolic Pathways of the Neonatal Mouse Heart Using a Quantitative Combinatorial Omics Approach. *Front Physiol* 2018 April 11;9:365.
- (7) Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, Moon J, Amatruda JF, Phelps KL, et al. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* 2014 April 24;157(3):565-579.
- (8) Stapor P, Wang X, Goveia J, Moens S, Carmeliet P. Angiogenesis revisited - role and therapeutic potential of targeting endothelial metabolism. *J Cell Sci* 2014 October 15;127(Pt 20):4331-4341.
- (9) Eelen G, Cruys B, Welte J, De Bock K, Carmeliet P. Control of vessel sprouting by genetic and metabolic determinants. *Trends Endocrinol Metab* 2013 December 01;24(12):589-596.
- (10) Foulquier S, Daskalopoulos EP, Lluri G, Hermans KCM, Deb A, Blankestijn WM. WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease. *Pharmacol Rev* 2018 January 01;70(1):68-141.
- (11) Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA, et al. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 2005 January 13;433(7022):156-160.
- (12) Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012 June 08;149(6):1192-1205.

- (13) Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 2009 October 01;461(7264):614-620.
- (14) Dittfeld C, Reimann G, Mieting A, Buttner P, Jannasch A, Plotze K, et al. Treatment with XAV-939 prevents in vitro calcification of human valvular interstitial cells. *PLoS One* 2018 December 07;13(12):e0208774.
- (15) Shin JH, Kim HW, Rhyu IJ, Kee SH. Axin is expressed in mitochondria and suppresses mitochondrial ATP synthesis in HeLa cells. *Exp Cell Res* 2016 January 01;340(1):12-21.
- (16) Xie S, Fu W, Yu G, Hu X, Lai KS, Peng X, et al. Discovering small molecules as Wnt inhibitors that promote heart regeneration and injury repair. *J Mol Cell Biol* 2019 March 29.
- (17) Henderson WR, Chi EY, Ye X, Nguyen C, Tien YT, Zhou B, et al. Inhibition of Wnt/beta-catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 August 10;107(32):14309-14314.
- (18) Wang C, Zhu H, Sun Z, Xiang Z, Ge Y, Ni C, et al. Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling promotes epithelial differentiation of mesenchymal stem cells and repairs bleomycin-induced lung injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014 August 01;307(3):C234-44.
- (19) Kadari A, Mekala S, Wagner N, Malan D, Koth J, Doll K, et al. Robust Generation of Cardiomyocytes from Human iPS Cells Requires Precise Modulation of BMP and WNT Signaling. *Stem Cell Rev* 2015 August 01;11(4):560-569.
- (20) Yao L, Zhao H, Tang H, Xiong J, Zhao W, Liu L, et al. Blockade of beta-catenin signaling attenuates toluene diisocyanate-induced experimental asthma. *Allergy* 2017 April 01;72(4):579-589.
- (21) Distler A, Deloch L, Huang J, Dees C, Lin NY, Palumbo-Zerr K, et al. Inactivation of tankyrases reduces experimental fibrosis by inhibiting canonical Wnt signalling. *Ann Rheum Dis* 2013 September 01;72(9):1575-1580.
- (22) Henri Vartiainen. Uudet lääkeaineet akuutin sydämen vajaatoiminnan hoidossa. Helsinki: Helsingin Yliopisto; 2014.